

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE TABATINGA – CESTB
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS DE *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. NATIVA
DO MUNICÍPIO DE TABATINGA/AM**

Tabatinga-Am
2022

CAROLINE VIEIRA ALVES

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS DE *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. NATIVA
DO MUNICÍPIO DE TABATINGA/AM

Monografia apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Alexandre Lima Santiago

Tabatinga-Am
2022

Agradecimentos

A Deus pela força e esperança para concluir esta etapa.

Ao Prof. Dr. Paulo Alexandre Lima Santiago, meu orientador, pelos ensinamentos, incentivo e dedicação. Apesar do breve tempo de orientação, aprendi muito com os conselhos, as ótimas ideias para o trabalho e soluções quando estas não caminhavam bem.

A minha mãe Inês, meu pai Raimundo, minha vó Olímpia e meus irmãos Mara, Joyce, Marciana, Jardel e João pela preocupação, apoio e torcida. E principalmente, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu me questionava se conseguiria.

Aos meus amigos, Rocio, Geovana, Nikson, Maria e Ivaelson, que ouviram incansavelmente minhas preocupações e me incentivaram nos inúmeros momentos de pessimismo durante a produção do trabalho. Nossas saídas e momentos de descontração vão deixar ótimas lembranças. Muito obrigada, vocês foram essenciais!

Aos Laboratórios de Química do INPA, do CESTB e Laboratório de Biorgânica do MBT da UEA pelos equipamentos utilizados durante o trabalho. E principalmente, ao Seu Bacelar, técnico do MBT, pela paciência, conselhos e por estar sempre disposto a nos ajudar no que fosse preciso.

As membras da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

Kalanchoe pinnata anteriormente conhecida como *Bryophyllum pinnatum*, é uma espécie herbácea nativa de regiões tropicais como a África. No Brasil, foi introduzida e propagada com sucesso, sendo comumente utilizada em comunidades distantes das grandes capitais. O suco das folhas costuma ser usado no tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, diarreias, vômitos, picadas de insetos e dores no corpo. Na literatura, são relatados compostos como antraquinonas e flavonóides que possuem diferentes atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, antitumoral, antiparasitária, antialérgica e hepatoprotetora. Com base nessas informações e considerando que existem poucos estudos sobre os compostos químicos de *K. pinnata* no Amazonas, principalmente em regiões mais distantes da capital, como no município de Tabatinga. O presente trabalho teve como objetivo determinar o perfil químico das frações do extrato bruto de *K. pinnata* nativa do município de Tabatinga - AM. Para isso, foi coletado material vegetal de um produtor local do município de Tabatinga. Em seguida, as folhas foram submetidas a uma extração por infusão. Logo após, o extrato bruto obtido foi fracionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações resultantes foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no comprimento de onda $\lambda=254$ nm e, utilizando as informações disponíveis na literatura, foi possível estabelecer uma relação entre o composto quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo, como responsável pelos picos cromatográficos observados nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após análises de Espectrometria de Massas (EM) foi possível propor quatro compostos: isorhamnetina-3-rutinosídeo, ramosyl hexosyl methyl quercetina, quercitrina e physcion. Todos com propriedades antioxidantes, conforme aponta a literatura. Em teste biológico para potencial antioxidante, obteve destaque a fração em clorofórmio. Assim, o presente estudo servirá de base para futuros trabalhos de caracterização de compostos químicos presentes em *K. pinnata* do município de Tabatinga.

Palavras-chave: Tabatinga; *K. pinnata*; perfil químico; metabólitos secundários.

Resumen

Kalanchoe pinnata, anteriormente conocida como *Bryophyllum pinnatum*, es una especie herbácea originaria de regiones tropicales como África. En Brasil, se introdujo y propagó con éxito, siendo de uso común en comunidades alejadas de las grandes capitales. El jugo de las hojas se usa a menudo en el tratamiento de enfermedades. Inflamación, úlceras gástricas, quemaduras, diarrea, vómitos, picaduras de insectos y dolores corporales. En la literatura se reportan compuestos como las antraquinonas y los flavonoides que poseen diferentes actividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, antitumoral, antiparasitaria, antialérgica y hepatoprotectora. Con base en esta información y considerando que existen pocos estudios sobre los compuestos químicos de *K. pinnata* en Amazonas, especialmente en regiones más alejadas de la capital, como en el municipio de Tabatinga. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el perfil químico de las fracciones del extracto crudo de *K. pinnata* originaria del municipio de Tabatinga - AM. Para ello se recolectó material vegetal de un productor local del municipio de Tabatinga. Luego, las hojas fueron sometidas a una extracción por infusión. Poco después, el extracto bruto obtenido se fraccionó con hexano, cloroformo y acetato de etilo. Las fracciones resultantes fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) a longitud de onda $\lambda=254$ nm y, utilizando la información disponible en la literatura, fue posible establecer una relación entre el compuesto quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil- (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido, como responsable de los picos cromatográficos observados en las fracciones de hexano, cloroformo y acetato de etilo. Después de los análisis de espectrometría de masas (MS), fue posible proponer cuatro compuestos: isorhamnetin-3-rutinósido, ramnosil hexosil metil quercetina, quercitrina y physcion. Todos con propiedades antioxidantes, tal y como apunta la literatura. En una prueba biológica de potencial antioxidante, se destacó la fracción en cloroformo. Así, el presente estudio servirá de base para futuras caracterizaciones de compuestos químicos presentes en *K. pinnata* en el municipio de Tabatinga.

Palabras clave: Tabatinga; *K. pinnata*; perfil químico; metabolitos secundarios.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1	Espécies do gênero <i>Kalanchoe</i> : A - <i>K. laetivirens</i> , B - <i>K. brasiliensis</i> , C - <i>K. gastonis-bonnieri</i> , D - <i>K. daigremontiana</i>3
Figura 2	Espécie <i>K. pinnata</i> : A - Arbusto medindo 1,10 metros de comprimento, B – Folha verde escura com margens crenadas; C - Gemas adventícias.....5
Figura 3	Perfil químico das frações de <i>K. pinnata</i> em $\lambda=254$ nm. Em A - fração aquosa, B - fração em hexano, C - fração em clorofórmio e D - fração em acetato de etila.....12
Figura 4	Espectro de LC-MS da fração em acetato de etila em modo negativo. 1 – Tr: 16.8 e 2 – Tr: 18.1.....14
Figura 5	Perfil de fragmentação. Em A - composto 1 e B – Fragmentação do íon m/z 623 em modo negativo.....14
Figura 6	Perfil de fragmentação do composto 2 com o íon m/z 623.....15
Figura 7	Perfil de fragmentação. Em A - composto 3 e B – Fragmentação do íon m/z 449 em modo positivo.....15
Figura 8	Perfil de fragmentação. Em A - composto 4 e B – Fragmentação do íon m/z 283 em modo negativo.....16
Tabela 1	Rendimentos das frações obtidas do extrato bruto de <i>K. pinnata</i>10
Tabela 2	Atividade antioxidante das frações de <i>K. pinnata</i> em teste DPPH..... 17
Tabela 3	Cl ₅₀ das frações de <i>K. pinnata</i>17

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Atividade Antioxidante
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE – MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
Da	Unidade unificada de massa atômica (Dalton)
LC	Cromatografia Líquida
<i>m/z</i>	Razão massa sobre carga
nm	Nanômetro
Tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta indicando a região do visível.

Sumário

1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	2
2.1 Gênero <i>Kalanchoe</i>	2
2.2 <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.....	3
2.2.1 Características morfológicas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	4
2.2.2 Potencial químico e biológico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	5
2.2.3 Ferramentas analíticas utilizadas na separação e caracterização de produtos naturais.....	7
3 Material e Métodos.....	8
3.1 Coleta e processamento do material vegetal.....	8
3.2 Elaboração do extrato das folhas de <i>Kalanchoe pinnata</i> e extração líquido-líquido.....	8
3.3 Determinação do perfil cromatográfico dos extratos.....	9
3.4 Análises de CLAE-MS/MS.....	9
4 Resultados e Discussão.....	9
4.1 Rendimento das frações obtidas a partir do extrato de <i>Kalanchoe pinnata</i>	9
4.2 Análises de CLAE das frações de <i>Kalanchoe pinnata</i>	9
4.3 Caracterização dos compostos químicos presentes na fração de acetato de etila de <i>Kalanchoe pinnata</i>	13
4.4 Determinação de atividade antioxidante.....	14
5 Considerações finais.....	18
Referências Bibliográficas.....	19

1 Introdução

A biodiversidade simboliza uma fonte inestimável de informação e matéria-prima, que fomenta sistemas de saúde de diferentes populações humanas, nas mais variadas regiões do planeta, onde plantas e animais são utilizados como fonte de medicamentos (COELHO; LIMA, 2018). Tais saberes são transmitidos através de gerações pelas comunidades, se tornando conhecimento popular (MINIKOWSKI; LUCCA, 2021).

Conhecer a diversidade botânica, sobretudo os moradores locais, auxilia na conservação das espécies e mantém o saber popular vivo (COELHO; LIMA, 2018). Apesar das plantas medicinais serem mais acessíveis em relação aos fármacos industrializados, é necessário ter cautela no uso, pois espécies que ainda não passaram por estudos aprofundados para análises de suas propriedades químicas podem acarretar efeitos adversos e serem potencialmente perigosas (STEFANELLO *et al.*, 2018).

No Brasil, em 2006 foi lançada a Política Nacional de Plantas Mediciniais, mediado pela da sistemática popular, já em 2008 deu-se início ao Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, sob administração do SUS, com sistematização e maior direcionamento a corporações empresariais de grande capital (RIBEIRO, 2015). Pouco tempo depois, no ano de 2009, o Ministério da Saúde elabora uma Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS, onde apresenta 71 espécies com potencial terapêutico, para orientar a cadeia produtiva e o desenvolvimento de pesquisas. Dentre as plantas está a espécie *Kalanchoe pinnata*, com necessidade de definição de espécie com cultivo, estudos e indicação de uso, mostrando ainda a carência em conhecimento fitoterápico (BRASIL, 2009).

Diversas pesquisas foram realizadas ao longo dos anos com a espécie *K. pinnata* verificando a existência dos compostos: ácidos orgânicos, alcaloides, ácidos graxos, bufadienolídeos, esteróides, flavonóides, gomas, carboidratos, mucilagens, saponinas, taninos, terpenos (MARRIAGE; WILSON, 1971; OKWU, JOSIAH, 2006 *apud* SOBREIRA, 2013) terpenoides com grupo carbonila e compostos fenólicos nas folhas, além de antraquinonas, curaminas e metilxantinas (LEGRAMANDI, 2011).

A espécie apresenta potencial antinociceptivo, antiedematogênico, anti-inflamatório (FERREIRA; TEIXEIRA, 2016; SOARES, 2017), cicatrizante, gastroprotetor, (SOBREIRA, 2013) hepatoprotetor (YADAV, 2003) antibacteriano, antiurease (NASCIMENTO *et al.*, 2017) inibidor de células cancerígenas

(VILLAMIZAR, 2014) analgésico, antialérgico, antianafilático, antitumoral, antiulceroso, antibacteriano, anti-histamínico, antifúngico, antiviral, depressor do sistema nervoso central, febrífuga, imunossupressor, imunomodulador, relaxante inseticida, muscular, sedativo (CORREA; BERNAL, 1989; PATTEWAR, 2012; SCHULER *et al.*, 2012) antidiabético (PATIL *et al.*, 2013), anti-hipertensivo (BOPDA *et al.*, 2018), antitússico, antiasmático (SALAMI *et al.*, 2013), diminuidor da hiperatividade da bexiga (BESTCHART *et al.*, 2013), imunossupressor (COUTUNHO *et al.*, 2012), inibidor da peroxidação lipídica (MOHAN *et al.*, 2012), antileishmania (MUZITANO *et al.*, 2006), restritivo em efeitos da leishmaniose murina (TORRES-SANTOS *et al.*, 2003) e amazonenses (DA SILVA *et al.*, 1995) protetor sobre estado de choque anafilático (CRUZ *et al.*, 2008).

Ainda hoje, a espécie não integra a lista de fitoterápicos regulamentados pela ANVISA. Isso mostra que, apesar das diversas propriedades apresentadas pela *K. pinnata*, de acordo com estudos, é indispensável a busca por novas informações, nos mais diversos pontos de localização da espécie, baseadas em pesquisas científicas, para que seja comprovada a eficiência de seus compostos químicos e avaliação de toxicidade dos mesmos para a produção de medicamentos, cosméticos etc. Para isso, o presente estudo tem como objetivo analisar os compostos químicos de *K. pinnata* através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das frações aquosa, hexano, clorofórmio e acetato de etila.

2 Revisão da Literatura

2.1 Gênero *Kalanchoe*

Pertencente à família das crassuláceas, abrangendo 125 espécies, algumas com propriedades venenosas, o gênero *Kalanchoe* (AKULOVA-BARLOW, 2009) é originário de regiões do Sudeste e Sul da África, podendo ser encontrado também na Índia, China e Brasil. Os representantes podem ser identificados através de observações da região floral da planta, apresentando flores gamopétalas, tetraméricas e diplopostômicas. Por serem xerófitas e possuírem a capacidade de acumular água em seus tecidos, são conhecidas como suculentas, sendo bem adaptadas, portanto, às regiões como a Bacia do Mediterrâneo e regiões onde não congelam (GARCÍA, 2009). O evento que resultou na separação do continente Africano e da atual ilha de Madagascar pode ter conferido aos membros, através de microadaptações das espécies, a capacidade de gerar compostos químicos com elevada importância

medicinal, sendo os flavonoides os compostos mais encontrados, considerados marcadores do gênero, detentores de ação gastroprotetora (SOBREIRA, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2018), cicatrizante, antioxidante (NAYAK *et al.*, 2010; PHATAK; HENDRE, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2017), fungicida (LEGRAMANDI, 2011), antiurease (NASCIMENTO *et al.*, 2017), anti-inflamatória (SOARES, 2017; FERREIRA; TEIXEIRA, 2016), bactericida (CHIBLI, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2017), e bacteriostática. (GARCÍA, 2009; CHIBLI, 2013; ARAÚJO, 2017).

Diversos são os estudos presentes na literatura para a determinação da presença dos compostos em espécies do gênero *Kalanchoe*, dentre eles a classe flavonoide se destaca. Pinheiro *et al.* (2020) utilizaram extrato das folhas de *K. laetivirens* (Figura 1 A) e relatam elevado teor de fenóis totais ($166,66 \pm 0,8$ mg EqAG/g) e o teor de flavonoides equivalente a $37,5 \pm 0,07$ mg EqC/g. Matos *et al.* (2016) também utilizaram solução extrativa, a espécie *K. brasiliensis* (Figura 1 B) foi submetida ao método espectrofotométrico, onde foi identificado um grande nível de flavonoides em solução de cloreto de alumínio em 15 minutos de reação. Carolina (2020) também utilizou extratos das folhas, *K. gastonis-bonnieri* (Figura 1 C) e *K. daigremontiana* (Figura 1 D) foram as espécies em estudo, sendo encontrados esteroides, terpenos, taninos e flavonoides, este último em maior intensidade na espécie *K. daigremontiana* correspondente a $11,04 \pm 0,50$ mg QE/g extrato seco em relação a espécie *K. gastonis-bonnieri*, na qual apresentou $7,81 \pm 0,53$ mg QE/g extrato seco.

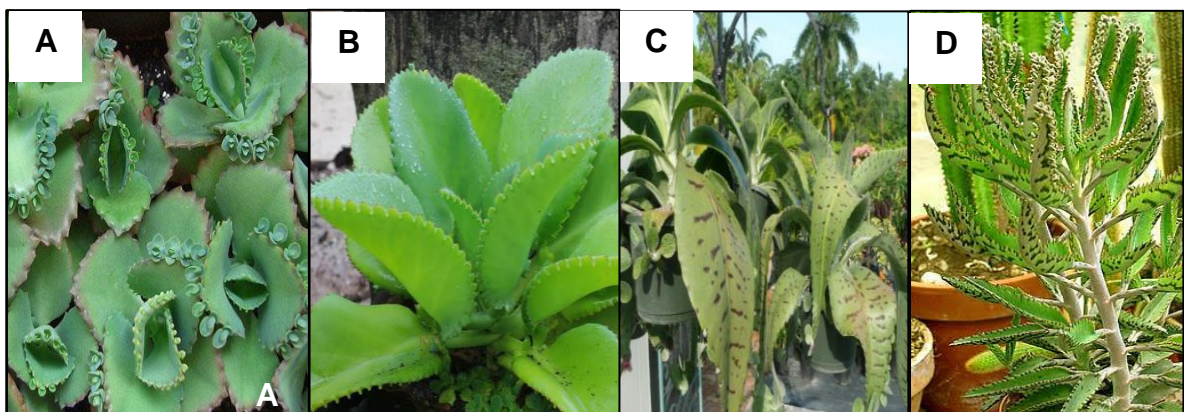


Figura 1: Espécies do gênero *Kalanchoe*: A - *K. laetivirens*, B - *K. brasiliensis*, C - *K. gastonis-bonnieri* e D - *K. daigremontiana*.

Fonte: matonoprato.com

2.2 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

A espécie possui diversos sinônimos, *Bryophyllum pinnatum* é o mais comum, podendo esta nomenclatura ser encontrada em diversos trabalhos. Acredita-se que o nome do gênero surgiu do nome chinês “Kalan Chauhuy” significando “aquela que cai e cresce”, já o epíteto específico vem do latim *pinnatus*, que significa “com penas” (AKULOVA-BARLOW, 2009).

A coerama popularmente chamada também de corama, courama, coirama, escama de pirarucu, diabinho, folha-da-fortuna e folha santa é uma das plantas mais utilizadas na medicina tradicional na região amazônica. Pode ser facilmente encontrada em quintais e mercados municipais. Seu uso varia, as folhas são geralmente consumidas em preparos de chás, sucos e saladas. Sua utilização está associada ao tratamento de disfunção cardiovascular, diabetes, inflamações e cicatrização (LORENZI; MATOS, 2008; MENEZES *et al.*, 2019).

2.2.1 Características morfológicas de *Kalanchoe pinnata*

Tendo preferência por áreas de clima quente e úmido, a espécie se caracteriza como perene e suculenta. Como mostra a Figura 2, a espécie é um arbusto que pode crescer entre 30 cm e 1,5 metros de comprimento, sendo o caule pouco ramificado, com folhas opostas, com as superiores compostas e inferiores simples, verde escuras e apresentando margens crenadas. As flores são tubulares, com cálice e corola inclinados. A floração ocorre entre os meses de novembro a março, com frutificação no mês de abril. A reprodução ocorre por meio de semente e propagação vegetativa, através de gemas adventícias que formam cavidades nas bordas das folhas, gerando novos indivíduos quando desprendidas (OKWU, 2006; NNAMDI, 2011; SOUZA, 2018).

As espécies *K. brasiliensis* e *K. pinnata* são comumente confundidas pela população por apresentarem semelhanças, por isso, dentre as características que as distinguem estão as ondulações e coloração das folhas, enquanto a *K. pinnata* apresenta folhas nitidamente crenadas com bordas avermelhadas, podendo variar de acordo com sua exposição a luz e nutrientes no substrato, a *K. brasiliensis* apresenta folhas subcrenadas sem alteração de cor nas bordas (ARAÚJO, 2017 *apud* LORENZI; MATOS, 2008). Tais diferenças podem ser notadas ao comparar as características morfológicas nas Figuras 1 e 2.



Figura 2: Espécie *K. pinnata*: A - Arbusto medindo 1,10 metros de comprimento; B - Folha verde escura com margens crenadas; C - Gemas adventícias.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Potencial químico e biológico de *Kalanchoe pinnata*

Dos membros pertencentes ao gênero *Kalanchoe*, a espécie *K. pinnata* merece destaque, pois é utilizada em diversos estudos para análise de seus compostos químicos, toxicológicos e farmacológicos, sendo utilizadas usualmente as folhas.

As investigações químicas a respeito de *K. pinnata* revelam a presença de compostos de diversas classes como ácidos orgânicos, alcaloides, ácidos graxos, esteroides, bufadienolídeos, saponinas, terpenos, taninos, flavonas e flavonoides (WU, *et al.*, 2006). Dentre estes, o composto mais comumente encontrados em *K. pinnata*, são os flavonoides derivados da quercetina (ICHIKAWA *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 1994; MUZITANO, 2006; EL ABDELLAQUI *et al.*, 2010; LEGRAMANDI, 2011; SOBREIRA, 2013; COELHO; LIMA, 2018; FERNANDES, 2019) e kaempferol (MUZITANO, 2006; TATSIMO *et al.*, 2012).

Conforme relatos encontrados na literatura, estes compostos são obtidos a partir de metodologias que envolvem o preparo de extratos etanólicos, hidroalcoólicos ou aquosos seguido de testes biológicos. A exemplo disto, tem-se o estudo realizado por Perez *et al.* (1999) que utilizaram o extrato etanólico de *Kalanchoe sp.* para reduzir lesões gástricas provocadas por indometacina. Utilizando o extrato aquoso de *K. pinnata* Ojewole (2005), Sousa *et al.* (2005) e Afzal *et al.* (2012), encontraram um potencial anti-inflamatório, pois houve uma redução em edemas de ratos, causados por estímulos químicos e físicos.

Para avaliar o potencial antioxidante, Chibli (2013) utilizou o extrato etanólico de *K. pinnata*, e determinou, através do método de DPPH, que a CI50 é pelo menos

16,43 µg/ml. O estudo também revelou que a fração acetato de etila apresentou uma CI50 de 9,44 µg/ml, valor próximo ao observado para a rutina, utilizada como controle positivo, que apresenta CI50 de 8,66 µg/ml. Já em estudo realizado por De Souza et al. (2013) foi avaliado somente o extrato aquoso de *K. pinnata*, sendo encontrado o IC50 de 98,13 µg/ml. Estes resultados justificam-se pela presença de flavonoides no extrato bruto e em suas frações.

A literatura relata que os extratos de *K. pinnata* apresentam compostos com atividade antimicrobiana. Biswas et al. (2011) observou que o suco de *K. pinnata* era utilizado para o tratamento de diarreia, desta maneira ao elaborar o extrato etanólico e testá-lo contra a bactéria patogênica da *Escherichia coli*, que é a responsável por infecções do trato gastrointestinal, observou-se a capacidade de inibir o crescimento do patógeno.

Em outro estudo, Okwu e Nnamdi (2011) isolaram e identificaram pela primeira vez o alcaloide etamino-7-Hex-1-in-5-ona fenantreno do extrato etanólico de *K. pinnata*. Este composto foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Villamizar et al. (2014) em ensaio da toxicidade da espécie, durante 28 dias utilizaram o extrato completo de *K. pinnata* e não foi verificado potencial tóxico.

É possível observar também a relevância em pesquisas de capacidade antioxidante através do extrato acetílico, e frações das folhas, com significativa redução às propriedades de íons metálicos oxidativos livres como íons férrico e cúprico; ultrapassando níveis apresentados pelas espécies *K. daigremontiana*, *K. milloti* e *K. nyikae*. (CHIBLI, 2013; PHATAK; HENDRE, 2014; BOGUCKA-KOCKA et al., 2018). Ainda, Nascimento et al. (2017) em estudo da avaliação anti-*Helicobacter pylori in vitro* verificou o potencial antioxidante, antibacteriano e antiurease da *K. pinnata*.

Neste seguimento, Soares (2017) verificou propriedades anti-inflamatória através do ensaio experimental de indução da inflamação utilizando extrato etanólico e aquoso de *K. pinnata*, onde a administração por via oral se mostrou mais eficiente para inibição do volume de exsudato e migração leucocitária.

Phatak e Hendre (2015) investigaram a atividade anti-urolitiática *in vitro* do extrato de *K. pinnata* e constatou a desintegração de partículas de cristais retidos nos rins, com aumento concentrações da fração.

Chibli (2013) constatou que o extrato etanólico e frações de folhas são ricos em substâncias fenólicas e flavonoides totais, tendo a fração em acetato de etila apresentado maior teor, possuindo também capacidade de sequestro de radicais livres, redução de íons metálicos e inibição da peroxidação lipídica, o que caracteriza a atividade antioxidante. Além disso, produziram atividade bactericida e bacteriostática, através da inibição de crescimento bacteriano.

Nayak et al. (2010) reforçam a capacidade do extrato etanólico, em estudo preliminar com ratos, verificaram atividade cicatrizante, esta resultante provavelmente à ação antioxidante de compostos polifenólicos, identificados no estudo. Também foi verificada por Phatak e Hendre (2014) a capacidade antioxidante total (TAC) de folhas de *K. pinnata*, sendo significativa dependendo do conteúdo fenólico.

Sobreira (2013) utilizando frações de acetato de etila e aquosa, em ensaio *in vitro* de úlcera aguda e subaguda observou significativa diminuição da lesão com concentração de flavonoides, indicando atividade cicatrizante e gastroprotetora. Araújo et al. (2018) mostram ainda, que o extrato reduziu significativamente os danos advindos de estresse oxidativo e à inflamação nas estruturas da mucosa de ratos lesões gástricas induzidas por etanol.

Em estudos, Ferreira e Teixeira (2016) obtiveram extratos a partir das inflorescências apresentando potencial antinociceptivo, antiedematogênico e anti-inflamatório, este último, presente tanto em extrato quanto em flavonoide.

Almeida (2019) verificou a eficácia do extrato hidroalcólico de *K. pinnata* sobre o *Plasmodium berghei*, causador da malária, sendo considerados níveis glicêmicos, funções renais, hepatológicas e hematológicas.

2.2.3 Ferramentas analíticas utilizadas na separação e caracterização de produtos naturais

Cromatografia é um método analítico utilizado de forma eficaz na separação, dos componentes químicos de amostras complexas tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio, dentre outras (SKOOG *et al.*, 2010).

Quando aliada a técnica de espectrometria de massa, é possível o perfil químico da amostra e essa é considerada como uma das melhores estratégias de análise de metabólitos secundários e seus derivados. No entanto, o metaboloma de um organismo como uma planta, é altamente complexo devido à diversidade de estruturas químicas geradas pelo metabolismo, logo se faz necessário utilizar

abordagens complementares para que se possa diferenciar e obter o maior número de compostos. Mesmo com o grande avanço de novas técnicas em cromatografia líquida, a identificação e a resolução dos picos cromatográficos ainda é uma tarefa difícil (KLITGAARD *et al.*, 2014; WEHRENS *et al.*, 2013).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa de ionização de misturas orgânicas complexas de qualquer espécie, aplicada em áreas como a biologia e química. Com a diversificação de técnicas analíticas é possível o emprego de técnicas hífenadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espetrômetro de Massas (CLAE-EM), fazendo com que a análise de uma amostra com um elevado número de metabólitos seja feita de forma rápida e através da comparação e classificação de perfis com a literatura é possível identificar os compostos presentes em extratos vegetais como os pertencentes a classe dos flavonoides (RODRIGUES *et al.* 2006; CABRAL, 2010; ABDELNUR, 2011).

3 Material e métodos

3.1 Coleta e processamento do material vegetal

O estudo foi de caráter experimental. Foram coletadas folhas de *K. pinnata* na área residencial do município de Tabatinga, durante o mês de novembro de 2021.

O material coletado foi devidamente armazenado em sacos de papel e em seguida conduzido ao Laboratório Multidisciplinar de Química do Centro de Estudos Superiores de Tabatinga da Universidade do Estado do Amazonas, onde foi lavado, pesado (3 kg) e posto para secar em estufa a 70 °C. Quando seco, foi registrado o peso de 260 g. Após isto, o material foi armazenado em frascos de vidro para serem transportados até o Laboratório de Biorgânica do MBT/ESA/UEA, em Manaus, para elaboração do extrato.

3.2 Elaboração do extrato das folhas de *K. pinnata* e extração líquido-líquido

Após aquecer 2 litros de água destilada até a temperatura de 100 °C, realizou-se a infusão de 260g das folhas. Ao atingir a temperatura ambiente, o experimento foi filtrado e em seguida a água foi eliminada com o auxílio de uma chapa aquecedora. Quando seca, a amostra foi ressuspensa em 500 ml de água destilada sendo centrifugada para retirada de sólidos em suspensão. Após este processo, realizou-se o fracionamento da amostra por extração líquido-líquido na proporção 1:1 com os solventes hexano, clorofórmio e acetado de etila.

Usando um rotaevaporador eliminou-se o solvente das frações e, o excesso de água foi eliminado em dessecador. Por fim, foram pesados 1 mg de cada uma das frações para as análises de CLAE-EM.

3.3 Determinação do perfil cromatográfico dos extratos

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítica foi realizada em um sistema Shimadzu CLAE (bomba LC-6 AD; desgaseificador DGU-20A5; detector SPD-20AV UV; comunicação modular CBM-20A) (Columbia, MD, USA) equipado com a coluna Luna C18 (250 × 10 mm, 5µm) (Phenomenex–Torrance, CA, USA). Todos os solventes usados na cromatografia foram de grau CLAE e adquiridos de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), e a água foi purificada usando um sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). A eluição foi realizada com um gradiente de 20-100% de B ao longo de 25 minutos a um fluxo de 1 ml/min. Os espectros UV foram registrados na faixa de 254 nm.

3.4 Análises de CLAE-EM/EM

Após selecionar a fração que apresentou o melhor perfil cromatográfico, esta foi diluída à concentração de 1 mg/ml, em MeOH – HPLC, e analisadas em cromatógrafo líquido modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A e injetor automático SIL-20A equipado com coluna Kinetex (Cote-Shell) C18 150 x 2,1 mm (100 Å, 2,6µ) acoplado à um espectrômetro de massas Brucker Daltonics, modelo Amazon Speed Ion trap, fonte ESI operando em modo positivo e negativo. O método utilizado foi um gradiente de 20-100% de B ao longo de 24 min em um fluxo de 1 ml/min com automs. Os resultados obtidos, foram processados com auxílio do software DataAnalysis (Brucker Daltonics).

4 Resultados e discussão

4.1 Rendimento das frações obtidas a partir do extrato de *K. pinnata*

Após a obtenção do extrato bruto o rendimento obtido foi de 19,15 g, aproximadamente 7,36% do material vegetal seco. Esta quantidade foi ressuspensa em água e fracionada com diversos solventes orgânicos. O rendimento das frações obtidas está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Rendimentos das frações obtidas do extrato bruto de *K. pinnata*

Código de trabalho	Fração	Peso seco (g)
1	Aquoso	3,08
2	Hexano	0,55
3	Clorofórmio	1,58
4	Acetato	0,72

Após a obtenção do rendimento, foram pesados 1 mg de cada fração para as análises de CLAE. Ao comparar os rendimentos das frações obtidos no presente estudo, com os observados no trabalho realizado por Ferreira et al. (2014) sobre *K. pinnata*, encontram-se certas similaridades pois, partindo de 2,52 kg de inflorescências frescas trituradas, postas em infusão com água destilada a 50 °C, obteve-se 90,2 g (3,82%) de extrato liofilizado. O extrato inicial foi então precipitado em etanol e em seguida particionado em solventes acetato de etila e água, produzindo as frações em acetato de etila com rendimento de 5,58 g (6,2%) e aquosa com 12,35 g (13,7%). Tais resultados mostram que, apesar do material utilizado na pesquisa dos autores e no presente estudo integrarem diferentes partes do vegetal, e consequentemente apresentarem características morfológicas distintas, quando se utilizam processos de extração semelhantes, é possível que o rendimento seja similar. Corroborando com os estudos, Muzitano (2006) utilizando 6,76 kg de folhas frescas, sendo extraídas por infusão com água destilada a 50 °C, obteve o extrato bruto, sendo particionado com CH₂Cl₂ e NaOH. A fase aquosa residual foi particionada em EtOAc, obtendo rendimento de 423,2 mg (0,006%), 113,0 mg (0,001%) e 1,67 g (0,02%), respectivamente. Deste modo, o método de extração mostra-se eficiente pois, trata-se de uma metodologia de simples realização para obtenção do extrato, além de simular a forma de preparo pela população, que consome constantemente a planta na forma de chá. Vale ressaltar que, após a obtenção dos extratos, tem-se a possibilidade de prospectar os seus componentes químicos e avaliar seu potencial biológico (SILVA, 2019).

Tatsimo (2012) utilizou a planta inteira seca, com 1,50 kg de material vegetal, aplicando a técnica de extração por percolação com metanol, em temperatura ambiente, reduzindo o material a 148 g, este gerando as frações de rendimento de 38,03 g (25,69%) para hexano e 34,03 g (22,99%) para acetado de etila. Em contraste, Lanna et al. (2019), Almeida (2019) e Sobreira (2013) utilizaram a técnica de extração

do tipo maceração. Sobreira (2013), por sua vez empregou etanol e água, onde comparou o extrato hidroetanólico (incubado durante 7 dias) de folhas colhidas em duas épocas do ano. O extrato inicial foi dissolvido em água destilada e passou por partição líquido-líquido gerando as seguintes frações, com seus respectivos rendimentos: clorofórmio com 1,1 g e 4,4 g (5,5% e 5,6%), acetato de etila com 0,74 g e 2,4 g (3,7% e 4%), e aquosa com 13,6 g e 41,6 g (68% e 69,3%). Concluindo que, há pouca diferença entre as frações advindas de amostras com pesos e coletadas em condições climáticas distintos. Semelhantemente, Chibli (2013) e Soares (2017) empregaram a técnica por maceração em etanol e metanol em folhas secas, sendo mantidas em contato com o solvente em períodos de 24 horas e duas semanas. O extrato inicial foi particionado líquido-líquido em solventes, dentre eles acetato de etila e hexano, obtendo as frações hexânica com 9,11 g e 7,6 g e em acetato de etila 4,37 g e 8,2 g, conferindo um rendimento de 22,8%, 49,35%, 10,9% e 53,25%, respectivamente. Desta maneira, a análise de Soares (2017) merece destaque pois, alcançou-se um rendimento notoriamente superior.

Comparando as metodologias, o presente estudo apresentou resultados próximos aos observados em outros estudos. As diferenças nos rendimentos podem ser explicadas por serem utilizadas diversas técnicas de extração e solventes com diferentes graus de polaridade, assim como a temperatura e o tempo de aplicação (OLIVEIRA *et al.*, 2016) influenciam na produção de extratos e frações com diferentes níveis de concentração e peso (MARQUES, 2005; BRUM *et al.*, 2009).

4.2 Análises de CLAE das frações de *K. pinnata*

Ao realizar as análises de CLAE, foram determinados os perfis químicos das frações de *K. pinnata* apresentados na Figura 3.

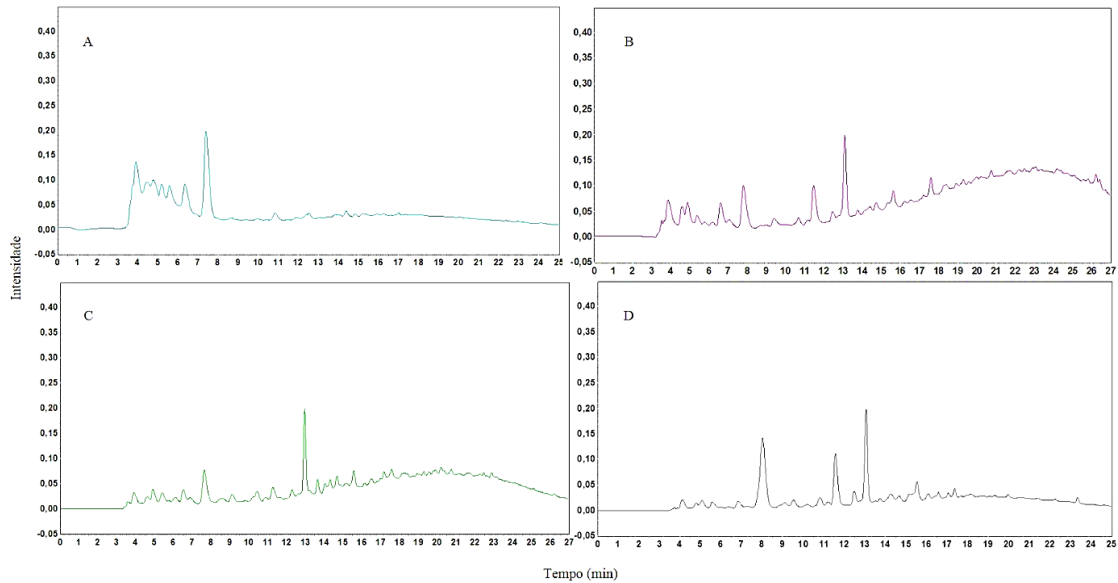


Figura 3: Perfil químico das frações de *K. pinnata* em $\lambda=254$ nm. Em A - fração aquosa, B - fração em hexano, C - fração em clorofórmio e D - fração em acetato de etila.

Conforme pode ser observado na figura acima, existe uma variedade de metabólitos em todas as frações que ocorrem entre 4 e 16 minutos. As frações em clorofórmio e acetato de etila, apresentam semelhanças com relação ao perfil cromatográfico nos tempos de retenção 13 minutos. Vale destacar que, a fração em hexano apresenta um composto majoritário em 13 minutos.

A literatura aponta que diversos compostos químicos absorvem no comprimento de onda de 254 nm, tais como flavonoides e antocianinas.

Em trabalho realizado por Araújo (2017) foi possível detectar no extrato aquoso, por meio de técnicas cromatográficas, os compostos pautelina-O-hexosídeo-O-hexosídeo, canferol, quercitina-O-hexosídeo, quercitina-O-deoxi-hexosídeo-O-pentosídeo, canferol-O-deoxi-hexosídeo-O-pentosídeo, eupafolina-O-deoxi-hexosídeo-O-pentosídeo e patuletina-di-O-acetil-deoxi-hexosídeo. Enquanto Sobreira (2013) verificou a presença da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo, também identificada por Coutinho et al. (2021), Cruz et al. (2008) e Muzitano et al. (2011). Os autores verificaram ainda a presença de quercitrina e kaempferol 3-O- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo, estes com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (ARAÚJO *et al.*, 2018), e 4',5-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7- β -D-glicopiranosídeo; compostos atribuídos aos grupos quercetina glicolisada, patuletina, eupafolina e derivados de kaempferol, todos com atividade gastroprotetora (SOBREIRA, 2013).

Em análise da fração hexânica, Chibli (2013) encontrou espectro de ultravioleta

com bandas características dos flavonoides quercetina no Tr: 8,83 minutos. Identificou ainda os constituintes químicos pentadecanal, éster de etila do ácido hexadecanóico, 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, éster de etila do ácido 9,12-octadecadienóico, éster de etila do ácido 9,12,15-octadecatrienóico, éster de etila do ácido octadecanóico, trans-esqualeno, α -tocoferol, 2-metil-7-fenilindol, 3-[4-(1-metil-etil)-fenil]-1-fenil-2-propen-1-ona, 2-acetoximetil-3-(metoxicarbonil)-bifenileno, 1-metil-2-fenilindol, e β -amirina, este último sendo o constituinte majoritário detectado.

Em estudo da fração acetato de etila, Gonçalves (2017) identificou os compostos miricetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo, miricetina 3-O-ramnopiranosídeo, meamsetina 3-O-pentosil ramnopiranosídeo, quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranosídeo, 4',5-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7- β -D-glicopiranosídeo, e kaempferol-3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranosídeo, e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranosídeo, verificado também por Sobreira et al. (2013), os autores ainda identificaram quercitrin com alto pico no Tr: 8.5 min, todos apresentaram atividade antiúlcera. Enquanto Chibli (2013) identificou o flavonoide Canferol no Tr: 15,54 min.

Visto que, a fração acetato de etila apresentou ao menos 3 compostos majoritários, esta foi selecionada para etapa de determinação do perfil químico.

4.3 Caracterização dos compostos químicos presentes na fração de acetato de etila de *K. pinnata*

Os espectros de massas da fração de acetato de etila de *K. pinnata* em modo negativo revelaram a presença dos íons m/z 623 e m/z 283. Em modo positivo foi observado a presença do íon m/z 449. Sendo assim, realizou-se experimentos complementares de LC-EM/EM a fim de separar os componentes químicos presentes nas amostras e obter os fragmentos dos íons detectados.

As análises de LC-EM, em modo negativo, revelaram uma duplicidade do íon m/z 623 sendo um mais retensivo que o outro, conforme pode ser observado na figura 4.

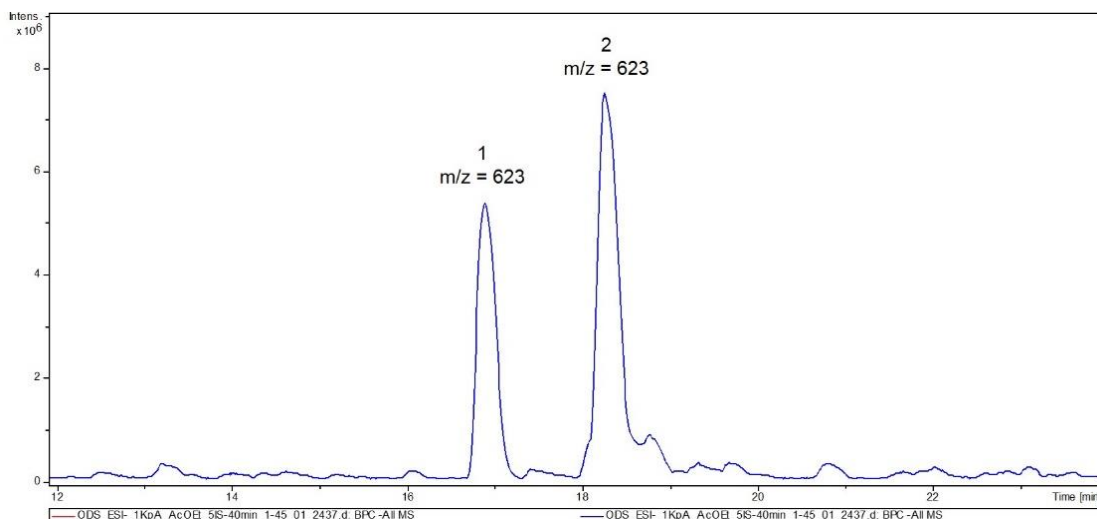


Figura 4: Espectro de LC-EM da fração em acetato de etila em modo negativo. 1 – Tr: 16.8 min e 2 – Tr: 18.1 min.

Para estabelecer uma diferença em termos de provável estrutura química correlacionada às massas observadas, utilizou-se os dados de EM/EM e, conforme pode ser observado na figura 5, o composto 1 de $[M-H]^-$ m/z 623 apresenta uma perda de 162 Da ($623 \rightarrow 461$) que segundo a literatura está associada a perda de uma hexose (SAID *et. al*, 2017). Após buscas minuciosas na literatura, caracterizou-se o composto 1 como sendo a isorhamnetina-3-rutinosídeo, um flavonoide presente em todos os grupos de plantas, com base no estudo realizado por Said et al. (2017) sobre a caracterização de compostos fenólicos de origem vegetal por LC-EM/EM.

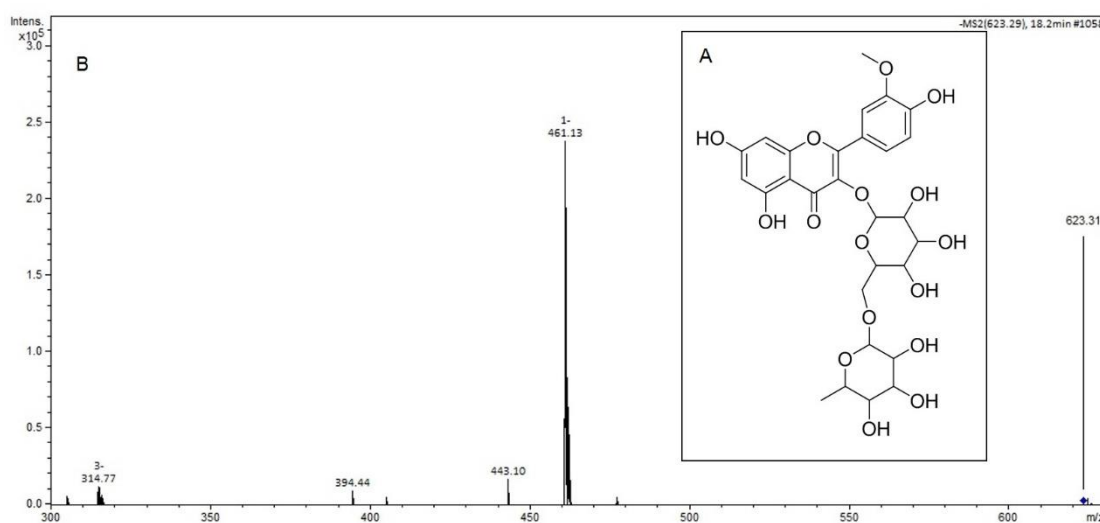


Figura 5: Perfil de fragmentação. Em A - composto 1 e B – Fragmentação do íon m/z 623 em modo negativo.

As análises de EM/EM do composto 2, apresentado na figura 6B, revelam duas perdas competitivas, uma de 31 Da (m/z 623 \rightarrow 591) que está correlacionada a metoxila (figura 7 A), e outra de 162 Da (m/z 461.21 \rightarrow 623), que está associada a uma hexose (figura 7 B). Com base no perfil de fragmentação realizado no presente estudo e no realizado por Said et al. (2017) o composto 2 foi caracterizado como sendo a rhanmosil hexosil metil quercetina, como mostra a figura 6A.

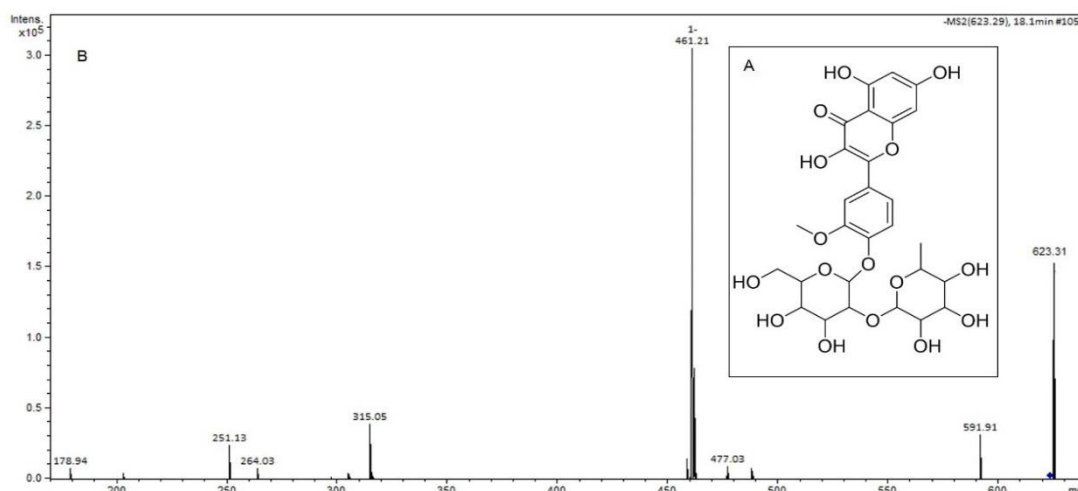


Figura 6: Perfil de fragmentação do composto 2 com o íon m/z 623.

Os espectros de EM/EM do composto 3 em modo positivo revelam que o íon $[M+H]^+$ m/z 449 sofre uma perda de 213 Da (449 \rightarrow 236). Com base no perfil de fragmentação observado no presente e no realizado por Pereira et al. (2017) em seu estudo sobre a composição química dos extratos das folhas de *K. pinnata*, o composto 2 foi caracterizado como a quercitrina.

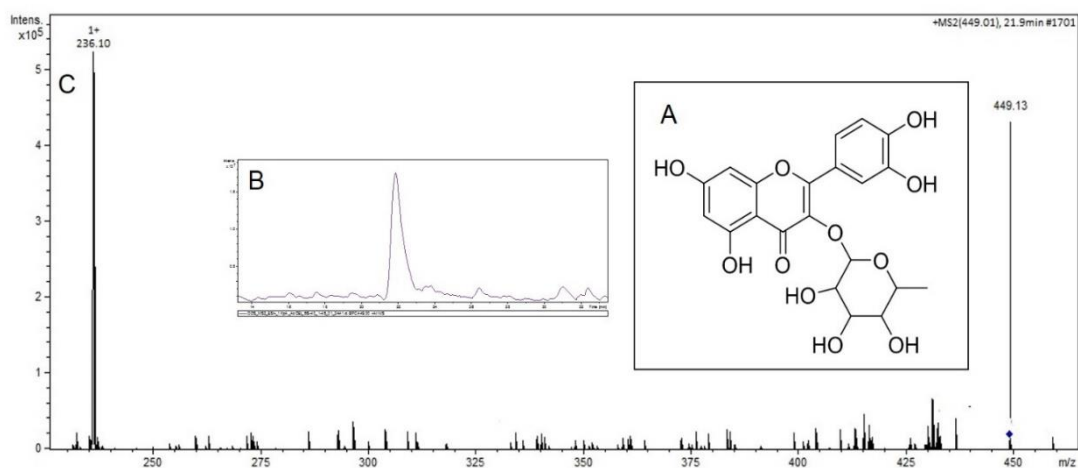


Figura 7: Em A - composto 3; B – LC-EM e C – Fragmentação do íon m/z 449 em modo positivo.

O perfil de fragmentação do composto 4 de [M-H] íon m/z 283, mostra que ocorre uma perda inicial de 15 Da ($283 \rightarrow 268$), equivalente a uma metila, levando a formação do íon [M-H] m/z 268. De posse desses dados e ao consultar a literatura, o composto 4 foi caracterizado como physcion conforme estudo realizado por Chen et al. (2016).

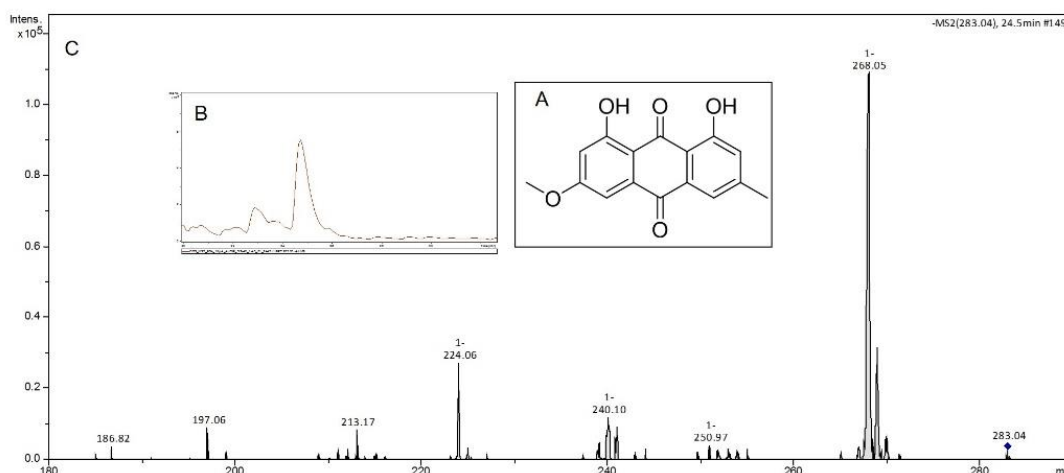


Figura 8: Em A - composto 4; B – LC-EM e C – Fragmentação do íon m/z 283 em modo negativo.

Os compostos caracterizados no presente estudo são pertencentes as classes flavonoide e antraquinona (PEREIRA *et al.*; 2017). Ambos são substâncias fenólicas, apresentando em suas estruturas moleculares anéis aromáticos. São conhecidos pelas propriedades antioxidantes, capazes de inibir e prevenir a degradação oxidativa das moléculas orgânicas. Em especial está a quercetina e o physcion, com a capacidade de eliminação e redução de radicais livres e regulação da presença de ferro (PIETTA, 2000; MUZITANO *et al.*; 2006; VÁSQUEZ, 2007; BEHLING, 2008; LIU, 2019; OLIVO *et al.*, 2021).

4.4 Determinação de atividade antioxidante

Na tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos após a determinação do percentual de atividade antioxidante (AA%), das frações de *K. pinnata* em concentrações decrescentes. Conforme pode ser observado, fração em acetato de etila apresentou o maior AA% quando leva-se em consideração as concentrações mais elevadas. Por outro lado, a fração em clorofórmio possui uma tendência de estabilidade do seu AA% ao longo das diluições.

Tabela 2: Atividade antioxidante das frações de *K. pinnata* em teste DPPH.

Concentração (µg/mL)	AA% - Aquoso	AA% - Acetato de etila	AA% - Clorofórmio	AA% - Hexano
1000	29,2	91,9	88,09	80,3
500	24,2	89,9	87,85	73,8
250	23,5	73,7	86,92	58,1
125	21,0	49,3	85,94	41,8
62,5	19,1	21,4	69,20	33,4
31,25	18,3	15,6	52,27	26,1
15,6	17,2	12,4	38,36	22,0
7,81	17,4	11,2	30,41	19,3

AA – Atividade antioxidante. Controle ácido gálico AA% = 95,2.

Comparando a AA% de espécies do gênero *Kalanchoe*, Bogucka-Kocka et al. (2018) observaram que todas as espécies testadas possuem capacidade antioxidante, onde *K. milloti* apresentou maior potencial, seguido por *K. pinnata*, *K. daigremontiana* e *K. nyi-kae*. A capacidade de proteção contra radicais superóxidos foi maior para *K. pinnata*.

Em estudo realizado por Majaz et al. (2011) sobre a avaliação da atividade antioxidante, das folhas de *K. pinnata*, utilizando a metodologia de DPPH, foi observado que, os extratos em metanol, clorofórmio e aquoso, das raízes, apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante.

Para análise de potencial antioxidante das folhas de *K. pinnata*, Phatak e Hendre (2015) testaram o extrato extrato metanólico e outras três frações. Ao comparar o valor do percentual de inibição antioxidante do extrato com o das frações, percebeu-se que o extrato metanólico apresentou um maior percentual de inibição.

Em ensaios realizados por Singh et al. (2019) e Chowdhury et al. (2016) com extrato etanólico, a partir das folhas de *K. pinnata*, para a determinação do potencial antioxidante, utilizando o ácido ascórbico como padrão para as análises, chegaram à conclusão que, conforme as concentrações aumentaram a AA% também aumentou, mantendo o potencial estável. Tais resultados também foram observados em todas as frações analisadas no presente estudo. Isso porque, a tendência é que, ao ser diluída, a fração também perca o potencial antioxidante. Tais estudos mostram que, metodologias envolvendo o DPPH são consideradas confiáveis, de rápida execução, de baixo custo e essenciais para a prospecção de compostos com atividade antioxidante.

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação a AA%, traçou-se a equação da reta e determinou-se a CI_{50} das frações de *K. pinnata*, conforme pode ser observado na Tabela 3. Dentre todas as frações, foi obtido o menor valor de CI_{50} para a fração em clorofórmio seguida da em hexano, acetato e aquosa.

Tabela 3: CI_{50} das frações de *K. pinnata*

Amostra	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
Fr. Aq	3,40
Fr. ACoet	0,21
Fr. Clor	0,03
Fr. Hex	0,10
Ác. Gal.	3,30

Em estudo realizado por Nascimento et al. (2017) sobre o potencial antioxidante do extrato etanólico, das folhas de *K. pinnata*, da região amazônica, foi determinado um valor de CI_{50} de 61,05 $\mu\text{g/mL}$. George et al. (2018) em análise de extratos metanólico e em clorofórmio em teste CI_{50} , utilizando o ácido ascórbico como padrão, determinou 10,45 $\mu\text{g/mL}$ e 95,34 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando maior potencial para o extrato metanólico. Comparando os resultados apresentados com os do presente estudo, percebe-se que os valores de CI_{50} são menores indicando um maior potencial antioxidante.

5 Considerações finais

O método utilizado no presente estudo se mostrou eficiente, sendo possível a preparação do extrato e a obtenção das frações com rendimento de acordo com a literatura, contribuindo para as análises de CLAE. Após o processamento de dados, observou-se uma boa separação das amostras, com íons majoritários que aumentam a chance de identificação ou isolamento dos compostos.

Foram encontradas diversas metodologias para a obtenção de extratos a partir das folhas de *K. pinnata*, sendo os extratos aquoso e acetato de etila mais utilizados, contendo em sua maioria compostos da classe dos flavonoides. Estudos comparativos mostram que estes derivados são detectáveis na faixa de 254 nm. No presente estudo, o tempo de retenção de 13 minutos se destaca por apresentar um grande pico nas

frações hexano, clorofórmico, e acetato de etila, indicando que possa ser o composto quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo pois, o mesmo foi obtido em diversos estudos encontrados na literatura.

As frações foram analisadas através de técnicas cromatográficas, como o LC-EM/EM, para a caracterização dos compostos químicos presentes nas frações. Podendo ser identificados 4 compostos: isorhamnetina-3-rutinosídeo, ramnosil hexosil metil quercetina, quercitrina e phycion. Todos com propriedades antioxidantes, conforme aponta a literatura.

Com relação aos valores de percentual de atividade antioxidante obtidos no presente estudo, todas as frações apresentaram resultado positivo. Após o cálculo dos valores de Cl_{50} , foi observado que fração em clorofórmio apresenta o valor mais expressivo seguido da fração em hexano, acetato de etila e aquosa.

Referências Bibliográficas

- ABDELNUR, P. V. Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.
- AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M. GUPTA, R.; ANWAR F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v.83, n.5, p.853-858, 2012.
- AKULOVA-BARLOW, Z. Kalanchoe. **Cactus and Succulent Journal**, v. 81, n. 6, p. 268-276, 2019.
- ALMEIDA, A. C. **Atividade antimalárica da *Kalanchoe pinnata* sobre o *Plasmodium berghei* em modelo experimental in vivo**. UFOPA, Santarém/PA, 2019.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa **Farmacopeia Brasileira**. 2^a Edição. Brasília, 2021.
- ARAÚJO, E. R. D. *Kalanchoe brasilienses* **Cambess e *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon: caracterização química, avaliação gastroprotetora e anti-inflamatória tópica**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/RN, 2017.
- ARAÚJO, E. R. D. *et al.* Gastroprotective and Antioxidant Activity of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* Leaf Juices against Indomethacin and Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.5, p.1265, 2018.
- BETSCHART, C.; VON MANDACH, U.; SEIFERT, B.; SCHEINER, D.; PERUCCHINI, D.; FINK, D.; GEISSBÜHLER, V. Randomized, double-blind placebo-controlled trial with *Bryophyllum pinnatum* versus placebo for the treatment of overactive bladder in postmenopausal women. **Phytomedicine**, v. 20, n.3-4, p.351-358, 2013.
- BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U. K.; SHILL, M. C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe Pinnata* Linn. (Family: Crassulaceae) Leaves and Steams. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 2011.
- BOGUCKA-KOCKA, A.; ZIDORN, C.; KASPRZYCKA, M.; SZYMCZAK, G.; SZEWCZYK, K. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018.
- BOPDA, O. S. M. *et.al.* Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. **Journal ethnopharmacol. Journal of ethnopharmacology**, v.153, p.400-407, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009.

BRUM, A. A. S.; DE ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Extraction methods and quality of the lipid fraction of vegetable and animal samples. **Química Nova**, v. 32, n.4, p.849-854, 2009.

CABRAL, E. C. **Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais**. São Paulo, 2010.

CAROLINA, V. M. J. **Estudio Farmacognóstico de las Especies *Kalanchoe gastonis-bonnieri* y *Kalanchoe daigremontiana***. Universidad Central Del Ecuador Facultad de Ciencias Químicas. 2020.

CHEN, G.; XUN, L.; FLORA, S.; MINGQUAN, G. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, v.21, n.1275, 2016.

CHIBLI, L. A. **Caracterização química e atividades biológicas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken**. 2013.

CHOWDHURY, K. A. A.; et al. Antioxidant, cytotoxic and thrombolytic activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* (LAM.) PERS. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 4, p. 309, 2016.

COELHO, C. A. P.; LIMA, R. A. Produção de sabonete ecológico a partir do extrato etanólico de *Kalanchoe Pinnata* Lam (Crassulaceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.3, n.1, p.18-23, 2017.

CORREA, J.; BERNAL, H. **Especies Vegetales Promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomos I – XII**. 1a. Edição Colômbia: Editora Guadalupe.1989.

COSTA, S. S.; JOSSANG, A; BODO, B.; SOUZA, M. L.; Moraes, V. L. Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. **Journal of Natural Products**, p.1503-1510, 1994.

COUTINHO, M. A. S; MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A. Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a Rich Source of T Cell-Suppressive Flavonoids. **Natural Product Communications**, v.7, n.2, p.175-8, 2012.

COUTUNHO, M. A. S.; CASANOVA, L. M.; NASCIMENTO, L. B. S; LEAL, D.; PALMERO, C.; TOMA, H. K.; SANTOS, E. P.; NASCIUTTI, L. E.; COSTA, S. S. Wound healing cream formulaterd with *Kalanchoe pinnata* major flavonoid is as effective as the aqueous leal extract cream in a rat model of excisional wound. **Natural Product Research**, v.35, n.24, p.6034-6039, 2021.

CRUZ, E. A. *et al.* Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International immunopharmacology**, v.8, n.12, p.1616-1621, 2008.

DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; MENSONÇA, S. C. F.; SILVA, E. M.; MORAES, V. L. G.; ROSSI-BERGMANN. Therapeutic effect oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta tropica**, v.60, n.3, p.201-210, 1995.

DE MENEZES, S. A. DE; PORTELA, B. Y. M.; DE LIMA, L. B.; VANDESMET, L. C. S. Ethnobotanical survey of medicinal species from Northeastern Brazil with anti-inflammatory potential. **Braz. J. of Develop**, v.5, n.10, p.18238-18249, 2019.

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.3, p. 1329-1338, 2010.

FERNANDES, J. M. *Bryophyllum pinnatum* e *Kalanchoe laciniata*: estudo fitoquímico, metabolômico e avaliação da inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops erythromelas* de extratos obtidos sob diferentes condições de cultivo. 2019.

FERREIRA, R. T. **Mecanismos envolvidos com as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-inflamatória do flavonoide majoritário das inflorescências e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Folha Da Fortuna)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 2016.

FERREIRA, R. T.; COUTINHO, M. A. S.; MALVAR, D. do C.; Costa, E. A.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, S. S.; VANDERLINDE, F. A. Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, 2014.

GARCÍA, C. C. *Kalanchoe spp.*: una fuente natural de nuevas sustancias bioactivas puestas de manifiesto por la Etnomedicina. **Encuentros en Biología**, v. 2, n. 124, 2009.

GEORGE, L. O.; RADHA, H. R.; SOMASEKARIAH. In vitro anti-diabetic activity and GC-MS analysis of bioactive compounds present in the methanol extract of *Kalanchoe pinnata*. **Indian Journ of Chemistry**, v.57B, p. 1213-1221, 2018.

GONÇALVES, F. S. **Mecanismos de ação relacionados à atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam) pers (Crassulaceae)**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

ICHIKAWA, M.; OGURA, M.; Lima, T. **Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum***. 1986

KLITGAARD, A.; IVERSEN, A.; ANDERSEN, M. R.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Anal Bioanal Chem**, p.1933-1943, 2014.

LANNA, E. G.; MOREIRA, A. M. S.; BITTENCOURT, V. C. S.; SOUZA, O, V; DENADAI, A. M. L. **Avaliação da atividade antioxidante de frações de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporadas em ciclodextrina.** 2019.

LEGRAMANDI, V. H. P. *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Rayn-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe pinnata* Pers. (Crassulaceae): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo. 2011.

LIU, Y.; CHU, S.; YANG, S.; PENG, Y.; REN, S.; WEN, B.; CHEN, N.). Physcion and physcion 8-O- β -glucopyranoside: A review of their pharmacology, toxicities and pharmacokinetics. **Chemico-biological interactions**, v. 3, n.310, 2019.

MAJAZ, Q.; M. KHURSHID; NAZIM, S.; RAHIL, K.; SIRAJ, S. Evaluation of antioxidant activity of *Kalanchoe pinnata* roots. **IJRAP**, v.2, n.6, p.1772-1775, 2011.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.3, n.2, p.74-76, 2005.

MATOS, L. L.; FERNANDES, J. M.; FERREIRA, M. R. A; LANGASSNER, S. M. Z.; SOARES, L. A. L. Avaliação de metodologia analítica espectrofotométrica para quantificação de flavonoides totais nas folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae). **Boletim Informativo Geum**, v.7, n.2, p.7-15, 2016.

MINIKOWSKI, A. G.; LUCCA, P. S. R. The use of medicinal and phytotherapy plants by young people in a municipality in the west region of paraná. **Rev. Thêma et Sciential**, v.11, n.2, 2021.

MUZITANO, M. F.; BERGONZIC, M. C.; DE MELO, G. O.; LAGE, C. L. S.; BILIA, A. R.; VINCIERIC, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.1, 132-137, 2011.

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, n.18, 2071-2077, 2006.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A., DE ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, S. A.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; COSTA, S. S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Médica**, v.72, n.1, p. 81-83, 2006.

NASCIMENTO, J. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos**, v.11, n.2, p.119-249, 2017.

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

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 27-33, 2006.

OKWU D. E; NNAMDI. F. U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. **J. Chem. Pharm. Res**, v.3, n.2, p.1-10, 2011.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 230-239, 2016.

OLIVO, T., KARINA, A.; MORENO, T., ELIZABETH, P. **Potenciales aplicaciones terapéuticas de antraquinonas naturales y sintéticas**. 2021.

PATIL, S. B.; DONGARE V. R.; KULKARNI, C. R.; JOGLEKAR M. M. Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* in streptozotocin-induced Diabetic Rats by glucose Independent insulin secretagogue Action. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 1411-1418, 2013.

PATTEWAR, S. V. *Kalanchoe pinnata*: Phytochemical and Pharmacological Profile. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n.4, p. 993-1000, 2012.

PEREIRA, K. M.; GRECCO, S. S.; FIGUEIREDO, C. R.; HOSOMI, J. K.; NAKAMURA, M. U.; LAGO, J. H. G. Chemical composition and cytotoxicity of *Kalanchoe pinnata* leaves extracts prepared using accelerated system extraction (ASE). **Natural Product Communications**, v.13, n.2, p. 163-166, 2017.

PEREZ, A. C.; CORREA, M. F.; BORGES, S. R. Anti-ulcer Activity from the leaves of *Bryophyllum sp.* **Arquives of Veterinary Science**, v.4, n.1, 1999.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. In-vitro Antiurolithiatic Activity of *Kalanchoe pinnata* Extract. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**, v. 7, p. 275-279, 2015.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p.32-35, 2014.

PHATAK, R.S.; HENDRE, A. S. Free radical scavenging activities of different fractions of *Kalanchoe pinnata*. **International Journal of PharmTech Research**, v.8, n.5, p. 854-863, 2015.

PINHEIRO, N. A. P.; ALVES, A. M. B.; CAMPOS, A. E. Q. R.; FURTADO, M. L. LIMA, A. S.; SIQUEIRA, S. M. C. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de *Bryophyllum laetivirens* (desc.) V.V. BYALT. **Revista Coleta Científica**, ano IV, v. 6, n.7, jan.-jun, 2020.

RIBEIRO, L. H. L. *et al.* **Território e macrossistema de saúde: os programas de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS)**. 2015.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; JUNIOR, S.B.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multi Ciência**. 2006.

SAID, R. B.; HAMED, A. I.; MAHALEL, U. A.; AL-AYED, A. S.; KOWALCZYK M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **Int. J. Mol. Sci.**, v.18, n.512, 2017.

SALAMI, E O.; OZOLUA, R. I; OKPO, S. O.; EZE, G. I.; UWAYA. Studies on the Anti-asthmatic and Antitussive Properties of Aqueous Leaf Extract of *Bryophyllum pinnatum* in Rodent Species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 421-425, 2013.

SCHULER, V; SUTER, K; FÜRER, K; EBERLI, D; HORST, M; BETSCHART, C; BRENNEISEN, R; HAMBURGER, M; MENNET, M; SCHNELLE, M; SIMÕES-WÜST, A P; VON MANDACH, U. *Bryophyllum pinnatum* inhibits detrusor contractility in porcine bladder strips a pharmacological study towards a new treatment option of overactive bladder. **Phytomedicine**, v. 19, n.10, p. 947-51, 2012.

SILVA, M. de P. *et al.* Utilização de Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde. Viçosa-MG ANAIS X SIMPAC. **Revista Científica** Univiçosa, v. 10, n.1, p.1031-1036, 2018.

SILVA, R. Y. A. **Estudo dos efeitos de espécies vegetais da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS sobre o receptor PXR**. 2019.

SINGH, S. K.; PATEL, J. R.; DANGI, A. Physicochemical, Qualitative and Quantitative Determination of Secondary Metabolites and Antioxidant Potential of *Kalanchoe Pinnata* (Lam.) Pers. Leaf Extracts. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v.9, n. 1, p. 220-224, 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, W. D.; F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8a. ed. Cengage Learning. 2010.

SOARES, A. M. S. **Propriedade anti-inflamatória de *Kalanchoe pinnata* pode estar associada à inibição nitrérgica e a ação antioxidante**. Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Santarém/PA, 2017.

SOBREIRA, F. C. **Avaliação da Atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Crassulaceae)**. Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, 2013.

SOUZA, C. A. de S. **Culturas de raízes e análise fitoquímica de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). UERJ. Rio de Janeiro. 2018.

SOUSA, P. C.; ROCHA, J. S.; PESSOA, A. M.; CARVALHO, J. C. Estudo preliminar da atividade anti-inflamatória de *Bryophyllum calycium* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 60-64, 2013.

STEFANELLO, S.; KOZERA, C.; RUPPELT, B. M.; FUMAGALLI, D.; CAMARGO, M. P.; SPONCHIADO, D. Levantamento do uso de plantas medicinais na Universidade Federal do Paraná, Palotina–PR, Brasil. **Extensão em Foco**, v. 1, n. 15, 2018.

TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. De D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research notes**, v.5, n.1, p.1-6, 2012.

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, n. 7, p. 801-803, 2003.

VÁSQUEZ, A., CALA, M.; MIRANDA, I. **Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia***. 2007.

VILLAMIZAR, L.; MOSQUERA, N.; MEJIA, A.; MUNOZ, P.; POMBO, O. **Hierba de bruja *Kalanchoe pinnata***. Fundación Universitaria Juan N. Corpas, p.1-28, 2014.

WEHRENS, R.; CARVALHO, E., MASUERO, D.; DE JUAN, A.; MARTENS, S. High-throughput carotenoid profiling using multivariate curve resolution. **Anal Bioanal Chem**, p. 5075-5086, 2013.

WU, Y., ZHU, S.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, S.; DING, Y.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v.8, n.4, p. 325-327, 2006.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p. 197-202, 2003.