

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISADORA MACHINSKI

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Kalanchoe*:
IMPACTO EM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE, PERFIL QUÍMICO E ANÁLISE
FARMACOBOTÂNICA

PONTA GROSSA

2024

ISADORA MACHINSKI

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Kalanchoe*:
IMPACTO EM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE, PERFIL QUÍMICO E ANÁLISE
FARMACOBOTÂNICA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a UNICENTRO e a UEPG, área: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA

2024



M149 Machinski, Isadora
Avaliação de extratos aquosos de três espécies de *Kalanchoe*
: impacto em modelo animal de ansiedade, perfil químico e análise
farmacobotânica / Isadora Machinski. Ponta Grossa, 2024.
102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.
Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

1. Antioxidantes. 2. Ansiedade. 3. Folha milagrosa. 4. HPLC-PDA-MS. 5.
Crassulaceae. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Miyoshi, Edmar. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à
Farmácia. IV.T.

CDD: 615

	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa	
---	--	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2024 DA MESTRANDA ISADORA MACHINSKI, REALIZADA NO DIA 22 DE MARÇO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e dois dias do mês de março de dois mil e vinte e quatro, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão aberta, via videoconferência, sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luís Beltrame, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda ISADORA MACHINSKI, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelo Professor Doutor Flávio Luis Beltrame (UEPG/PR), demais Doutores: (membros titulares): Michele Debiasi Alberton (FURB/SC) e Cássia Gonçalves Magalhães (UEPG/PR); (membros suplentes): Juliana Bonametti Olivato (UEPG/PR) e Lorene Armstrong (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: “AVALIAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE TRÊS ESPÉCIES DE KALANCHOE: IMPACTO EM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE, PERFIL QUÍMICO E ANÁLISE FARMACOBOTÂNICA”. Encerrado o exame de defesa procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata _____ aprovada _____. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim, Paulo Maury Redkva, Secretário Setorial dos Programas de Pós-Graduação na Área da Saúde.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____

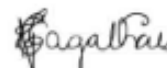


Flávio Luís Beltrame (UEPG/PR)
Presidente

MICHELE DEBIASI
ALBERTON:02919403907
03907

Assinado de forma digital por
MICHELE DEBIASI
ALBERTON:02919403907
Data: 2024.03.26 09:18:05
+03'00'

Michele Debiasi Alberton (FURB/SC)
Titular



Cássia Gonçalves Magalhães (UEPG/PR)
Titular



Paulo Maury Redkva
Secretário Setorial

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser proteção no meu caminho, por ser a luz que me ilumina. Por ser amor e misericórdia. Por ser através Dele e para Ele o meu propósito.

Aos meus pais, Elcio e Silmara por serem responsáveis pela educação que tive, por terem proporcionado toda a minha formação. Por sempre acreditarem em mim, por serem exemplos e inspiração. Pai, com você aprendi a medir todos os riscos a calcular as variáveis, mas aproveitar com o coração sempre aberto as aventuras da vida. Mãe, você é responsável pela mulher que sou hoje, com você aprendi a não desistir, a lutar pelo que eu acredito e construir o caminho até onde quero chegar. Mas além de tudo, vocês me ensinaram o amor. Amo vocês!

À minha família, porque os valores que aprendi com vocês me tornam melhor a cada dia. Ao meu noivo, Bruno, por ser minha inspiração de determinação e me auxiliar de incontáveis formas; ao meu irmão, Elcio Jr., por ser exemplo de dedicação para mim; aos meus avós, por serem donos dos melhores abraços e aos meus padrinhos por serem orientação nas minhas escolhas.

Aos meus amigos, que souberam trazer alegria e ânimo em todos os momentos vividos juntos. Que trouxeram força nas horas difíceis e que comemoraram junto nos momentos de alegria.

Aos professores e mestres que tive durante toda minha caminhada escolar e acadêmica. Por todo o conhecimento transmitido, por serem inspiração para mim. Se sou quem sou hoje, devo muito a vocês. Minha grande admiração.

Às alunas de iniciação científica, Debora Bueno e Aline Santos, por podermos compartilhar ensinamentos e conhecimentos, crescendo juntas.

À Prof^a. Dr^a. Jane Manfron e Valter Paes de Almeida por compartilharem seus conhecimentos e me ensinarem muito do que desenvolvi neste trabalho.

Ao Vinícius Monteiro Schafkka, pela amizade desde a graduação, por toda ajuda e contribuição para a execução deste trabalho e principalmente por me ajudar a ver os potenciais da minha pesquisa além do que eu sabia.

À Evelyn Assis de Andrade, pela nossa linda amizade, por cada consolo e por cada impulsionamento, por cada detalhe que me ensinou, por incontáveis horas que cedeu para a realização desse trabalho, por todo amor e dedicação à pesquisa que você transmitiu a mim. Por ter me acolhido e por confiar em mim.

Ao Prof. Dr. Edmar Miyoshi, por coorientar este projeto, pelo acompanhamento dos experimentos e prontidão em sanar minhas dúvidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, a quem guardo enorme admiração. Por contribuir com tantos ensinamentos para a minha formação e para a minha vida. Por todas as oportunidades a mim proporcionadas. Por ser um profissional tão exemplar e transmitir em tudo o que faz tamanha dedicação e comprometimento.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, que ofereceu as condições necessárias para a minha formação.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”
(Marie Curie)

RESUMO

As espécies de *Kalanchoe*, reconhecidas como "folhas milagrosas" pela medicina tradicional, apresentam desafios de diferenciação devido às suas semelhanças morfológicas, aumentando o risco de uso inadequado. O estudo investigou a diversidade botânica e as propriedades bioquímicas de três espécies de *Kalanchoe*, que são amplamente utilizadas na medicina tradicional devido às suas alegadas propriedades terapêuticas, especialmente para o tratamento de ansiedade. As espécies estudadas, *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata*, e *Kalanchoe pinnata*, foram coletadas e processadas por métodos etnofarmacológicos para extração de compostos bioativos. O estudo empregou uma combinação de técnicas analíticas, incluindo análise botânica, determinação de conteúdo fenólico e flavonoide, ensaios de atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC), e métodos cromatográficos avançados (CLUE-DAD, CLUE-EM, e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (CCD-AP)). Essas abordagens permitiram uma avaliação detalhada da composição química das espécies e uma comparação de suas capacidades antioxidantes. Os resultados indicaram diferenças significativas entre as espécies. Análises botânicas revelaram que apenas *K. pinnata* possui cristais de oxalato de cálcio no pecíolo, um marcador distintivo dessa espécie. Em termos de capacidade antioxidante, a espécie *K. marmorata* mostrou os valores mais altos em todos os ensaios, sugerindo uma concentração superior de compostos bioativos. A análise cromatográfica confirmou a presença de flavonoides, principalmente derivados da quercetina, com *K. pinnata* exibindo um perfil químico único de quercetina arabinosil ramnosídeo. Adicionalmente, a pesquisa explorou a atividade ansiolítica através de avaliação *in vivo*, sugerindo que de *K. pinnata* pode oferecer benefícios no tratamento da ansiedade. Esta descoberta ressalta a importância de diferenciar precisamente as espécies de *Kalanchoe* para uso medicinal apropriado e seguro. Este estudo fornece *insights* valiosos sobre as características botânicas e farmacológicas de *Kalanchoe*, que podem guiar o uso tradicional dessas plantas, bem como inspirar futuras investigações científicas e aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Antioxidantes, ansiedade, folha milagrosa, CLUE-DAD-EM, CCD-AP, Crassulaceae.

ABSTRACT

Kalanchoe species, known as "miracle leaves" in traditional medicine, pose differentiation challenges due to their morphological similarities, increasing the risk of improper use. The study investigated the botanical diversity and biochemical properties of three *Kalanchoe* species, widely used in traditional medicine for their alleged therapeutic properties, especially in treating anxiety. The species studied, *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata*, and *Kalanchoe pinnata*, were collected and processed using ethnopharmacological methods for the extraction of bioactive compounds. The study employed a combination of analytical techniques, including botanical analysis, determination of phenolic and flavonoid content, antioxidant activity assays (DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC), and advanced chromatographic methods (HPLC-PDA, HPLC-MS, and HPTLC). These approaches allowed for a detailed evaluation of the chemical composition of the species and a comparison of their antioxidant capacities. The results indicated significant differences among the species. Botanical analyses revealed that only *K. pinnata* has calcium oxalate crystals in the petiole, a distinctive marker of this species. In terms of antioxidant capacity, *K. marmorata* showed the highest values in all assays, suggesting a higher concentration of bioactive compounds. Chromatographic analysis confirmed the presence of flavonoids, mainly quercetin derivatives, with *K. pinnata* displaying a unique chemical profile of quercetin arabinosil rhamnoside. Additionally, the research explored the anxiolytic activity through in vivo evaluation, suggesting that *K. pinnata* may offer benefits in anxiety treatment. This discovery underscores the importance of accurately differentiating *Kalanchoe* species for appropriate and safe medicinal use. This study provides valuable insights into the botanical and pharmacological characteristics of *Kalanchoe*, which can guide the traditional use of these plants as well as inspire future scientific investigations and therapeutic applications.

Keywords: Antioxidants, anxiety, miracle-leaf, UPLC-PDA-MS, HPTLC, Crassulaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Etapas do processo de estudo das plantas medicinais.....	17
Figura 02 – Publicações sobre espécies do gênero <i>Kalanchoe</i> por ano.....	19
Figura 03 – Gêneros aceitos pertencentes a família Crassulacea.....	20
Figura 04 – Representação esquemática do metabolismo ácido crassuláceo.....	21
Figura 05 – Mapa de distribuição geográfica da ocorrência das espécies do gênero <i>Kalanchoe</i>	23
Figura 06 – Núcleo fundamental dos flavonoides.....	26
Figura 07 – Flavonoides mais descritos para o gênero <i>Kalanchoe</i>	27
Figura 08 – Publicações por ano das espécies <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	28
Figura 09 – Principais usos populares das espécies <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	29
Figura 10 – Sintomas do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG).....	38
Figura 11 – Processos que contribuem para a neuroinflamação.....	40
Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental do Teste claro-escuro.....	50
Figura 13 – Aspectos morfológicos das espécies <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	52
Figura 14 – Aspectos anatômicos das folhas das espécies <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	54
Figura 15 – Aspectos anatômicos do pecíolo de <i>Kalanchoe pinnata</i> e <i>K. crenata</i>	55
Figura 16 – Aspectos anatômicos dos caules das espécies <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	56
Figura 17 – Aspectos histoquímicos das folhas de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	58
Figura 18 – Cristal presente no pecíolo de <i>K. pinnata</i>	59
Figura 19 – Aspectos histoquímicos dos caules de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	60
Figura 20 – Cromatogramas e espectros de UV-Vis de <i>Kalanchoe crenata</i> obtidos por CLUE-DAD.....	62

Figura 21 – Cromatogramas e espectros de UV-Vis de <i>Kalanchoe marmorata</i> obtidos por CLUE-DAD.....	63
Figura 22 – Cromatogramas e espectros de UV-Vis de <i>Kalanchoe pinnata</i> obtidos por CLUE-DAD.....	64
Figura 23 – CCD de Alta Performance em extratos de <i>Kalanchoe</i> após derivatização combinada de PN-Anisaldeído.....	72
Figura 24 – CCD-AP em extratos de <i>Kalanchoe</i> após derivatização com Folin-Ciocalteu, DPPH [•] e ABTS ^{•+}	73
Figura 25 – Derivados de quercetina em <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	77
Figura 26 – Quercetina-glicosiladas em <i>Kalanchoe crenata</i>	78
Figura 27 – Cromatograma CLUE-EM de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	78
Figura 28 – Cromatograma CLUE-EM de <i>Kalanchoe crenata</i>	79
Figura 29 – Cromatograma CLUE-EM de <i>Kalanchoe marmorata</i>	80
Figura 30 – Cromatograma CLUE-EM de <i>Kalanchoe pinnata</i>	81
Figura 31 – Comparação entre os espectrogramas evidenciando a sugestão da presença da quercetina arabinopiranosil ramnopiranosideo somente em <i>Kalanchoe pinnata</i>	82
Figura 32 – Efeitos dos extratos aquosos de <i>K. crenata</i> , <i>K. marmorata</i> e <i>K. pinnata</i> – 1g/L (A) e 0,1g/L (B) -no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=9 animais/grupo), no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Substâncias identificadas para espécies <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	33
TABELA 02 – Atividade antioxidante relatada para espécies <i>Kalanchoe crenata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	36
TABELA 03 – Grupos experimentais.....	49
TABELA 04 – Conteúdo de fenólicos totais em extratos de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	65
TABELA 05 – Conteúdo de flavonoides totais em extratos de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	66
TABELA 06 – Atividade antioxidante de extratos de <i>Kalanchoe crenata</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	O ESTUDO DAS PLANTAS MEDICINAIS	16
3.2	FAMÍLIA CRASSULACEAE J.St.-Hil	20
3.3	GÊNERO <i>Kalanchoe</i> Adans	22
3.4	TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	42
4.2	EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	42
4.3	ENSAIOS FARMACOBOTÂNICOS	42
4.4	TESTES HISTOQUÍMICOS	43
4.5	ANÁLISE QUÍMICA	43
4.5.1	Análises CLEU-DAD	43
4.5.2	Quantificação do teor de fenólicos	44
4.5.3	Quantificação do teor de flavonoides	44
4.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	44
4.6.1	Redução do radical DPPH*	44
4.6.2	Redução do radical ABTS**	45
4.6.3	Capacidade de absorção do radical oxigênio (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC</i>)	45
4.7	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA PERFORMANCE (CCD-AP)	46
4.7.1	Preparo de amostras e padrões	46
4.7.2	Aplicação e desenvolvimento	46
4.7.3	Derivatização	46
4.7.4	Cromatografia em camada delgada acoplada a espectrometria de massas (CCD-EM)	47
4.8	ANÁLISE CLUE-EM	48

4.9 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i>	48
4.9.1 Cuidados éticos.....	48
4.9.2 Animais.....	48
4.9.3 Grupos Experimentais.....	49
4.9.4 Teste claro-escuro.....	49
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 ENSAIOS FARMACOBOTÂNICOS.....	51
5.1.1 Análise morfológica.....	51
5.1.2 Análise microscópica.....	53
5.2 TESTES HISTOQUÍMICOS.....	57
5.3 ANÁLISE CLAE-DAD.....	61
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	65
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	66
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	67
5.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA PERFORMANCE (CCD- AP).....	70
5.7.1 Análise EM-EM de compostos identificados por CCD.....	74
5.8 CLEU-EM.....	77
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA.....	83
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA.....	99
APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS DURANTE O MESTRADO.....	100

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda espécie vegetal ou partes dela que contêm substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (Brasil, 2021).

Recentemente, estudos científicos estão sendo centrados na comprovação de atividades de plantas medicinais, popularmente usadas, com propriedades psicoativas. Exemplo dessa afirmação são as espécies pertencentes ao gênero *Kalanchoe*. Estas são popularmente conhecidas como folha-da-fortuna, mãe-de-milhares, saião, folha milagrosa (Ferreira *et al.*, 2014) e, de modo geral, o uso é feito sob diferentes formas de preparo se dá no tratamento de lesões e feridas na pele (Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020); tratamento de infecções, queimaduras, reumatismo, dor de ouvido, úlcera, diarreia, tosse, febre, disfunção cardiovascular, diabetes, para prevenção e tratamento do câncer e também para tratamento de quadros depressivos e ansiosos (Molina *et al.*, 2019; Zawirska-Wojtasiak *et al.*, 2019; Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020).

O gênero *Kalanchoe*, pertencente à família Crassulaceae apresenta aproximadamente 133 espécies descritas, sendo muitas delas nativas do continente africano (COSTA *et al.*, 2018). Dessas, 4 espécies identificadas apresentam predominância no Brasil (*Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw.; *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh.; *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym-Hamet & H. Perrier; e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Abdel-Raouf, 2012; Flora do Brasil, 2020). Dentre as classes de metabólitos químicos já observadas em espécies do gênero *Kalanchoe*, podem-se destacar os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos); os glicosídeos cardioativos, e os esteroides (Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020; Hegazy *et al.*, 2021). Assim, a fim de garantir a segurança do uso de plantas medicinais, são necessários estudos abrangendo a caracterização das espécies, a identificação das atividades biológica e farmacológica dos metabólitos presentes (Berlinck *et al.*, 2017).

O transtorno de ansiedade é considerado um dos transtornos mentais mais comuns na sociedade contemporânea, acometendo de 10% a 20% da população (OMS, 2022). Terapias farmacológicas atualmente usadas são eficazes no tratamento e incluem diferentes classes medicamentosas. Porém, independentemente dessa disponibilidade de fármacos, muitos destes apresentam efeitos adversos e baixo perfil de tolerabilidade que limitam a efetividade do tratamento (Kukuia *et al.*, 2015).

Devido a estes aspectos, alguns pacientes tendem a buscar preparações à base de plantas para o tratamento de vários tipos de problemas mentais. As plantas medicinais são utilizadas para cuidados básicos de saúde na maioria dos países subdesenvolvidos, onde aproximadamente 80% da população utiliza essas para tratamento de doenças (Kukuia *et al.*, 2015).

Assim sendo, o presente trabalho justifica-se pela discrepância de estudos entre algumas espécies de *Kalanchoe* que são utilizadas etnofarmacologicamente para o tratamento de quadros de ansiedade, sendo necessária a diferenciação das estruturas morfológicas e anatômicas, a identificação de possíveis grupos de compostos químicos e a avaliação de ações biológicas (antioxidante e ansiolítica) dessas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar química e morfoanatomicamente três espécies do gênero *Kalanchoe* (*Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*) assim como estudar o potencial biológico dessas espécies frente a modelos *in vitro* de atividade antioxidante e modelo *in vivo* de ansiedade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características anatômicas de partes vegetativas aéreas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*;
- Realizar análises histoquímicas com partes vegetativas aéreas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*;
- Qualificar a constituição química dos extratos aquosos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Detector Ultravioleta (CLUE-UV);
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonoides nos extratos obtidos de folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos obtidos de folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* por meio de diferentes ensaios *in vitro*: DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC;
- Avaliar quimicamente os extratos obtidos de folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* por meio de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (CCD-AP);
- Avaliar quimicamente os extratos obtidos de folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM);
- Investigar a atividade ansiolítica dos extratos aquosos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* por meio de ensaio claro-escuro com a espécie de peixe *Danio rerio*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O ESTUDO DAS PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais desempenharam um papel essencial na história e continuam tendo uma importância até os dias de hoje. Ao longo dos séculos, várias culturas têm explorado os benefícios terapêuticos das plantas para tratar uma ampla gama de doenças e promover a saúde. No entanto, com o surgimento dos primeiros registros escritos e o desenvolvimento do conhecimento erudito, tornou-se possível descrever várias plantas e seus usos terapêuticos, resultando nos primeiros compêndios que posteriormente deram origem às Farmacopeias (Marques *et al.*, 2021).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos é uma prática mundialmente disseminada, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pois as novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e as ideias de desenvolvimento sustentável proporcionam os estudos das plantas medicinais, despertando novamente um interesse geral na fitoterapia (Mattos, 2018).

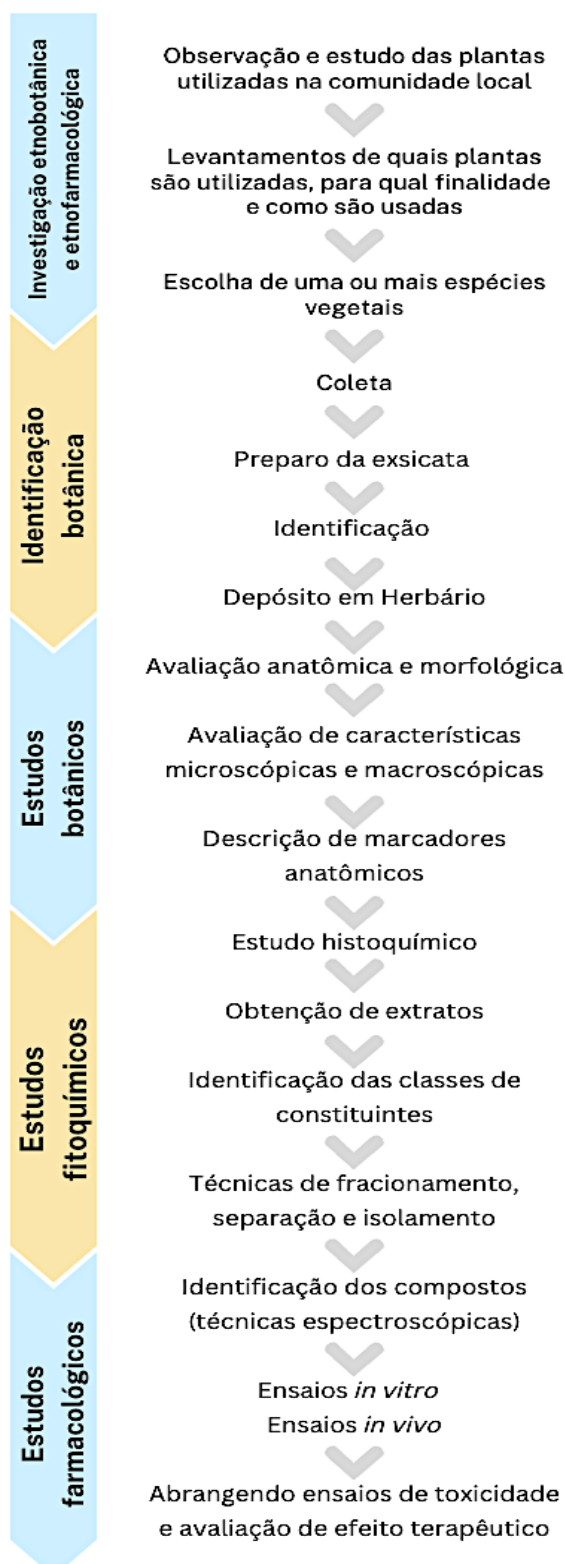
No Brasil, observa-se o aumento na busca pelo conhecimento e pela utilização de plantas e produtos derivados delas, movido pelos avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes para uso, assim como o emprego de plantas medicinais, no atendimento primário à saúde (Bruning *et al.*, 2012).

Entretanto ainda existem plantas que são utilizadas medicinalmente a partir do conhecimento popular e com poucas informações científicas, farmacológicas e de possíveis efeitos adversos, podendo acarretar danos à saúde, principalmente devido ao fato da população acreditar que essas não apresentam toxicidade, por se tratarem de produtos naturais (Firmo *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2017).

Para isso, ao decorrer do progresso da ciência, traçaram-se abordagens para o estudo de plantas medicinais. O estudo de fitoquímica clássica pode ser representado pelas etapas apresentadas na **Figura 01**, as quais iniciam-se pela escolha do material vegetal. Realiza-se a sua correta identificação, evitando trocas entre espécies do mesmo gênero; seguem os estudos botânicos, analisando-se características microscópicas e macroscópicas e evidenciando-se marcadores

anatômicos; e análise de marcadores químicos, atingindo a investigação de atividades farmacológicas (Maciel *et al.*, 2002; Firmo *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2017).

Figura 01 – Etapas do processo de estudo clássico das plantas medicinais.



Fonte: a autora.

Porém, a pesquisa com plantas medicinais é uma área em constante evolução que combina conhecimentos tradicionais com abordagens científicas modernas para explorar o potencial terapêutico das plantas. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente nesse campo, impulsionado pelo aumento da demanda por tratamentos naturais e pela necessidade de novos fármacos em face de doenças emergentes e resistência aos medicamentos convencionais (Marques *et al.*, 2021).

Em termos de abordagens direcionadas, a pesquisa com plantas medicinais tem se concentrado em várias áreas-chave. Uma delas é a identificação de compostos bioativos com potencial terapêutico. Isso envolve bibliotecas de compostos naturais identificados como aqueles com atividades farmacológicas promissoras. Além disso, a pesquisa com plantas medicinais está explorando abordagens inovadoras, como a biotecnologia e a engenharia metabólica de plantas, além da inserção da química verde nos processos de pesquisa (Saxena, 2023; Funari *et al.*, 2023).

Assim, abordagens computacionais, como a modelagem de interações proteína-ligante, também são empregadas para prever a atividade biológica de compostos candidatos e otimizar os testes biológicos utilizando determinada espécie, extrato ou substância isolada (Saxena, 2023; Funari *et al.*, 2023).

Destacando a avaliação das atividades biológica e farmacológica, nesta etapa seguem-se as indicações terapêuticas empíricas divulgadas por estudos etnobotânicos, permitindo assim a avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal. Então, elencam-se quais serão as atividades que serão investigadas e quais testes podem ser desenvolvidos. Dentre o grande número de ensaios possíveis, tem-se a divisão entre testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação de algumas atividades, sendo atividade citotóxica, anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica e ação no Sistema Nervoso Central (SNC) alguns dos alvos de grande importância terapêutica (Maciel *et al.*, 2002; Firmo *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2017).

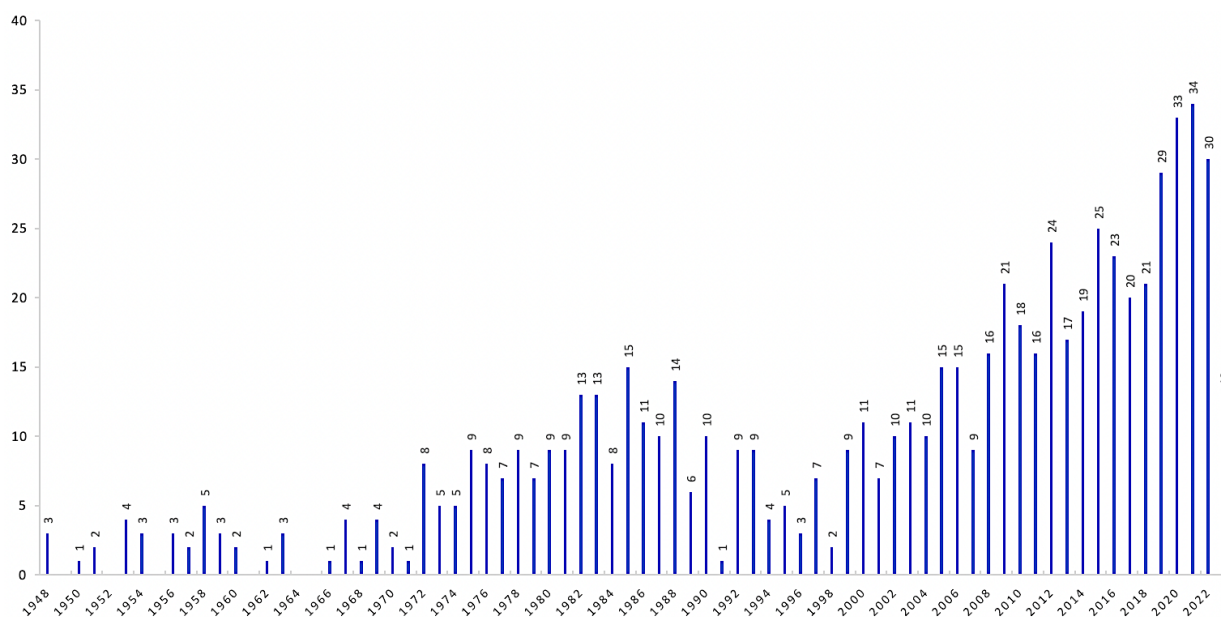
Das atividades acima citadas, a atividade antioxidante apresenta expressividade, visto que os processos oxidativos estão presentes na etiologia de inúmeros quadros clínicos, como doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, as quais apresentam o estresse oxidativo promotor de desregulações sinápticas. Os antioxidantes protegem as células do organismo contra danos causados pelos radicais livres (espécies químicas instáveis e reativas produzidas naturalmente durante o metabolismo celular). O estresse oxidativo causado pelos radicais livres pode levar a danos celulares, inflamação e envelhecimento precoce, contribuindo para o

desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas. Ao avaliar a atividade antioxidante, é possível identificar substâncias que podem contribuir com a prevenção e tratamento de doenças (Troubat *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2021; Teleanu *et al.*, 2022).

Diante disso, a identificação dos princípios ativos e seus mecanismos de ação nas plantas representa um dos maiores desafios para as áreas de química, bioquímica e farmacologia. As plantas contêm uma variedade de constituintes e seus extratos podem exibir efeitos sinérgicos devido à presença de compostos de classes e/ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. Ao estudar a atividade biológica de extratos vegetais, é crucial selecionar ensaios que detectem efeitos específicos. Esses ensaios devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (Maciel *et al.*, 2002; Firmo *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2017).

Dentre as espécies que apresentam grande interesse à ciência, encontram-se as espécies do gênero *Kalanchoe*, pertencentes à família Crassulaceae. Nota-se que, nos últimos 10 anos, o número de publicações referentes a estas espécies vegetais aumentou em aproximadamente 50% (**Figura 02**), abrangendo estudos botânicos, agrícolas, fitoquímicos, farmacológicos e de toxicidade, devido ao uso dessas plantas na cultura popular.

Figura 02 – Publicações sobre espécies do gênero *Kalanchoe* por ano.



Fonte: a autora.

Dados: PubMed, 2023.

3.2 FAMÍLIA CRASSULACEAE J.St.-Hil.

A família Crassulaceae compreende 36 gêneros (**Figura 03**), com espécies distribuídas principalmente na África e Ásia, predominantemente em Madagascar e Arábia (Fernandes *et al.*, 2019; POWO, 2023; Smith *et al.*, 2019).

Figura 03 – Gêneros aceitos pertencentes à família Crassulaceae.

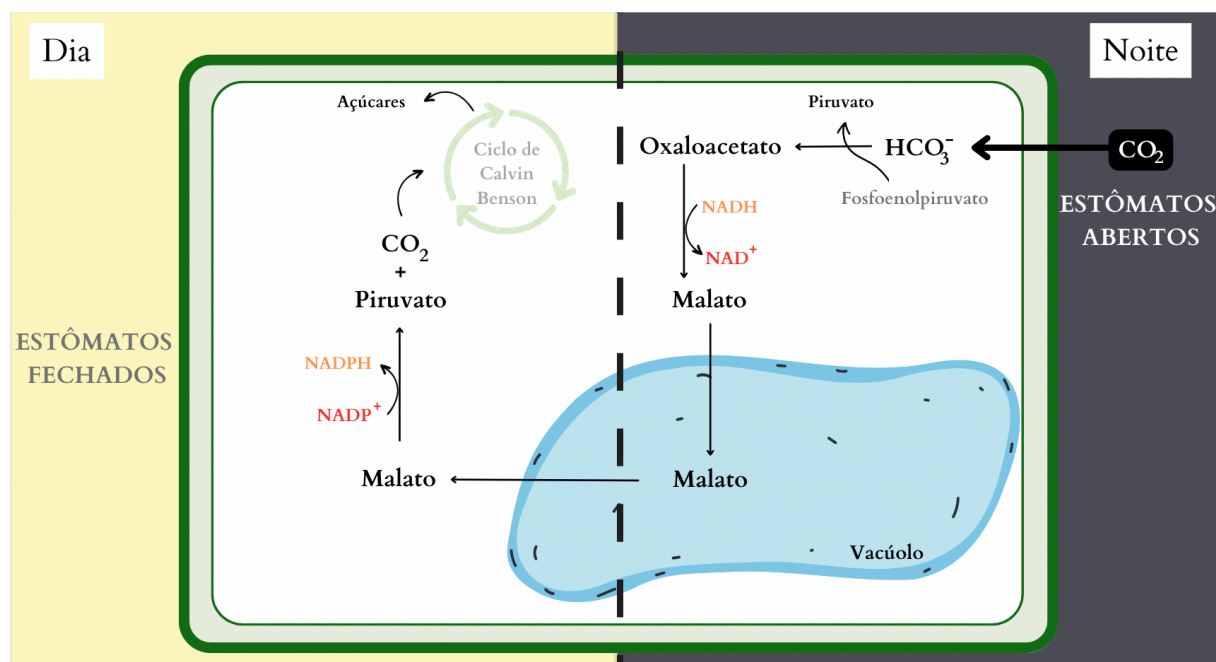
CRASSULACEAE J.ST.-HIL.	<i>Adromischus</i> Lem.	<i>Monanthes</i> Haw.
	<i>Aeonium</i> Webb & Berthel.	<i>Orostachys</i> Fisch.
	<i>Afrovivella</i> A.Berger	<i>Pachyphytum</i> Link, Klotzsch & Otto
	<i>Aichryson</i> Webb & Berthel.	<i>Perrierosedum</i> (A.Berger) H.Ohba
	<i>Chaloupkaea</i> Niederle	<i>Petrosedum</i> Grulich
	<i>Chiastophyllum</i> (Ledeb.) A.Berger	<i>Phedimus</i> Raf.
	<i>Cotyledon</i> L.	<i>Pistorinia</i> DC.
	<i>Crassula</i> L.	<i>Prometheum</i> (A.Berger) H.Ohba
	<i>Cremnophila</i> Rose	<i>Pseudosedum</i> (Boiss.) A.Berger
	<i>Dudleya</i> Britton & Rose	<i>Rhodiola</i> L.
	<i>Echeveria</i> DC.	<i>Rosularia</i> (DC.) Stapf
	<i>Graptopetalum</i> Rose	<i>Sedum</i> L.
	<i>Hylotelephium</i> H.Ohba	<i>Sempervivum</i> L.
	<i>Hypagophytum</i> A.Berger	<i>Sinocrassula</i> A.Berger
	<i>Kalanchoe</i> Adans.	<i>Thompsonella</i> Britton & Rose
	<i>Kungia</i> K.T.Fu	<i>Tylecodon</i> Toelken
	<i>Lenophyllum</i> Rose	<i>Umbilicus</i> DC.
	<i>Meterostachys</i> Nakai	<i>Villadia</i> Rose

Fonte: POWO, 2023.

Esta família, do ponto de vista botânico, abrange importantes gêneros de plantas suculentas, com várias espécies conhecidas no paisagismo. Em relação às características anatômicas, as espécies são herbáceas, carnosas ou subarbustos, com folhas planas ou cilíndricas, suculentas, opostas ou verticiladas, alternas, simples, ocasionalmente compostas, pinadas, sem estípulas, tendo pontas avermelhadas em suas raízes. Suas flores são tetrâmeras e podem apresentar diferentes colorações, sendo a coloração das folhas, flores e raízes determinada pelo pigmento antocianina, o qual é intensificado pela incidência da luz (Moreira *et al.*, 2012).

A maior parte dos membros desta família se destaca por suas estruturas xeromórficas, as quais permitem adaptações a condições extremas, como à luz forte e à escassez de água, pois possuem em seu tecido um compartimento que é capaz de estocar e inibir a perda de água tanto nas folhas quanto no caule (Herrera *et al.*, 2011; Milad *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2019). Isto ocorre em decorrência do metabolismo ácido crassuláceo (CAM - *Crassulacean Acid Metabolism*), uma adaptação metabólica para realizar a fixação fotossintética de CO_2 e redução da perda de água através do fechamento estomático durante o dia (quando as temperaturas são altas) e abertura estomática durante a noite (quando as temperaturas são inferiores). Dessa forma, as plantas CAM assimilam o CO_2 atmosférico em ácidos à noite: incorporam o CO_2 , como HCO_3^- em oxaloacetato, o qual é reduzido a malato, e fixam o CO_2 no nível de carboidrato durante o dia seguinte (**Figura 04**) (Moreira, *et al.* 2012; Yang *et al.*, 2017; Gotoh *et al.*, 2019).

Figura 04 – Representação esquemática do metabolismo ácido crassuláceo.



Fonte: a autora.

Esse metabolismo é específico para plantas com adaptação a ambientes secos e, por esta razão, têm a relevante característica de apresentar espécies com folhas suculentas, tornando este um marcador da família. As plantas CAM têm importante papel na pesquisa de aspectos bioquímicos, ecofisiológicos e filogenéticos (Gotoh *et al.*, 2019).

3.3 GÊNERO *Kalanchoe* Adans

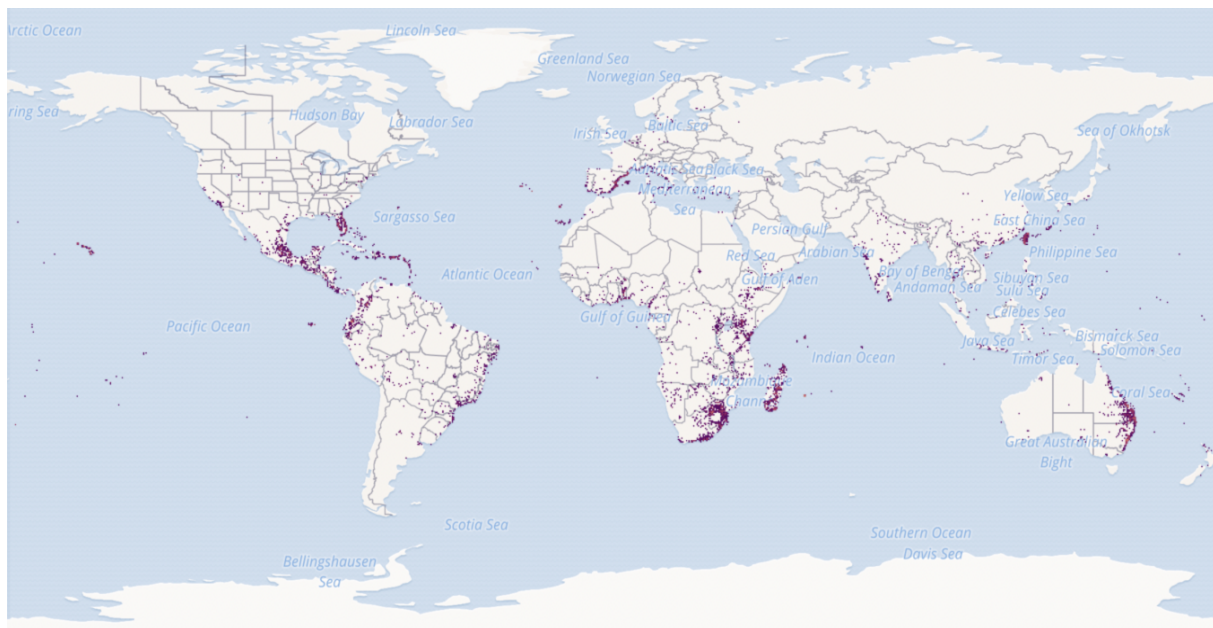
O nome *Kalanchoe* refere-se à transcrição fonética do termo em chinês "*Kalan Chauhuy*", que tem como significado "o que cai e que cresce" em explicação à forma como ocorre a propagação dos embriões foliares a partir da margem das folhas em algumas espécies do gênero. Outra explicação para o nome pode ser em referência ao termo indiano "*kalanka*" "*chaya*", que significa mancha ou ferrugem e brilho, respectivamente, em alusão às folhas brilhantes e às raízes avermelhadas (Akulova-Barlow, 2009).

A utilização do termo *Kalanchoe* foi empregado primeiramente por Michel Adanson em 1763 (Akulova-Barlow, 2009) e, atualmente, as espécies pertencentes a estes gêneros são conhecidas no Brasil por: bálsamo, saião, folha-de-fortuna, mãe-de-milhares, folha-milagrosa, folha-da-costa, folha-da-bahia, coirama-branca, coerama (Milad *et al.*, 2014).

O gênero *Kalanchoe*, ou *Bryophyllum*, compreende 133 espécies descritas que são nativas de Madagascar e distribuídas globalmente em locais de clima quente, como África, América do Sul e Ásia (**Figura 05**) (GBIF, 2023; Costa *et al.*, 2008), sendo apenas 13 espécies identificadas do gênero relatadas em todas as regiões do Brasil (Flora do Brasil, 2023).

As espécies desse gênero apresentam como características principais serem herbáceas ou sublenhosas, pouco ramificadas, atingindo de 1 a 1,5 metros de altura, especialmente durante a floração. Suas folhas são opostas, suculentas, ovaladas e de margem crenada com 10 a 20 cm de comprimento. Suas flores podem medir até 5 cm de comprimento, são pendentes e dispostas em inflorescências. Os frutos são membranáceos e as sementes elipsoides (Lorenzi; Matos, 2008; Kamboj; Saluja, 2009). O caule destas espécies é constituído de células de paredes finas que se aprofundam pela epiderme, sendo toda a estrutura impregnada por resina, formando uma fina camada capaz de reduzir a evaporação de líquidos em algumas espécies (Milad *et al.*, 2014).

Figura 05 – Mapa de distribuição geográfica da ocorrência das espécies do gênero *Kalanchoe*.



Fonte: GBIF - Global Biodiversity Information Facility. *Kalanchoe* Adans. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/2985928>. Acesso em: abril de 2023.

O gênero *Kalanchoe* é composto por plantas amplamente utilizadas na medicina popular devido ao seu fácil acesso e cultivo. O seu uso ocorre para tratamentos como: problemas inflamatórios, feridas e úlceras, como anticoagulante, vermífugo e larvicida, antitumoral e cicatrizantes (Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020). Também é relatado o uso para tratamento de quadros de diarreia, vômito, picadas de insetos e animais peçonhentos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (Almeida *et al.*, 2000; Okwu; Josiah, 2006; Kamboj; Saluja, 2009). Porém não há relatos e evidências que descrevam a quantidade de planta ou a dosagem para cada uso terapêutico. A forma de administração se dá principalmente pelo uso do suco ou extrato aquoso (Akentieva *et al.*, 2021; Garcia-Perez *et al.*, 2020; Majaz *et al.*, 2011a, b; Richwagen *et al.*, 2019; Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020).

Tendo em vista o seu amplo uso popular, várias pesquisas na área estão voltadas para analisar os efeitos farmacológicos relacionados a este gênero, a fim de comprovar o seu potencial terapêutico. As principais atividades já estudadas foram: citotóxica, anti-inflamatória e antioxidante.

Exemplos de estudos que estão sendo feitos com essa finalidade são os de avaliação da atividade citotóxica frente a diferentes linhagens celulares incluem: *K. glaucescens* avaliada em células de leucemia (Adam *et al.*, 2018); *K. flammea* em células de câncer de próstata (Arias-González *et al.*, 2018); *K. crenata* frente a

células de carcinoma (Kuete *et al.*, 2017); e *K. tubiflora* em células de câncer de pulmão (Hsieh *et al.*, 2015)). As espécies *K. pinnata* e *K. daigremontiana* são as mais estudadas em relação ao potencial citotóxico frente a diferentes linhagens celulares (El Abdellaoui *et al.*, 2010; Bogucka-Kocka *et al.*, 2016; Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016; Bhavsar; Chandel, 2019; Radwan-Pragłowska *et al.*, 2021; Elizondo-Luévano *et al.*, 2021; García-Perez *et al.*, 2021).

Com relação aos usos como agentes anti-inflamatórios, as espécies *K. pinnata* (Anadozie *et al.*, 2018; de Araújo *et al.*, 2019), *K. brasiliensis* (de Araújo *et al.*, 2019), *K. crenata* (Awortwe *et al.*, 2015); *K. daigremontiana*, *K. tubiflora*, *K. x houghtonii* (García-Perez *et al.*, 2021) e *K. gracilis* (Lai *et al.*, 2010) já foram avaliadas.

O potencial antioxidante foi relatado principalmente para as espécies *K. pinnata* (Bhatti *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2013; Bogucka-Kocka *et al.*, 2016; Hara *et al.*, 2018; Anadozie *et al.*, 2018; Radwan-Pragłowska *et al.*, 2021) e *K. daigremontiana* (Bogucka-Kocka *et al.*, 2016; Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016; Elizondo-Luévano *et al.*, 2021; García-Perez *et al.*, 2021). Porém essa atividade tem sido estudada para várias outras espécies do gênero *Kalanchoe*.

Dentre outras propriedades terapêuticas relatadas na literatura, tem-se: efeito anticoagulante de *K. daigremontiana*, por meio da inibição de trombina (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2017) e como modulador da atividade enzimática da plasmina (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2018); atividade antidepressiva (Frimpong-Manso *et al.*, 2015, Kukuia *et al.*, 2015) e ação antinefropática de *K. crenata* (Kamgang *et al.*, 2012) e atividade de inibição da ação do veneno de *Bothrops jararaca* por *K. pinnata* e *K. brasiliensis* (Fernandes *et al.*, 2016).

A espécie *K. pinnata* também foi avaliada quanto à ação anti-hipertensiva (Bopda *et al.*, 2014), imunomodulatória e antileishmania (Gomes *et al.*, 2010), anticonvulsante (Mora-Pérez; Hernández-Medel, 2016), antidiabética (Patil *et al.*, 2013) e antifúngica (Ahmed *et al.*, 2013).

Estudos relativos ao isolamento e caracterização de substâncias naturais produzidas a partir do metabolismo secundário de plantas são estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade nas investigações química, farmacológica e biológica de plantas medicinais, uma vez que a maioria dos medicamentos atualmente utilizados são derivados de produtos naturais. Dessa forma, o detalhamento dos metabólitos secundários presentes em cada espécie vegetal

possibilita a sua caracterização e correlação com as propriedades terapêuticas que pode vir a apresentar (Berlinck *et al.*, 2017).

Nesse sentido, vários componentes de diferentes espécies do gênero *Kalanchoe* já foram identificados e isolados. Pesquisas relativas à sua composição química demonstraram que as classes mais encontradas são os esteroides, ácidos fenólicos e flavonoides.

Dentro da classe dos esteroides, destacam-se os glicosídeos cardioativos do tipo bufadienolídeos, os quais apresentam estrutura química baseada em um anel de lactona de seis membros e compreendem substâncias estruturalmente similares e com atividades semelhantes às de dois conhecidos glicosídeos cardíacos: digoxina e digitoxina. (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016).

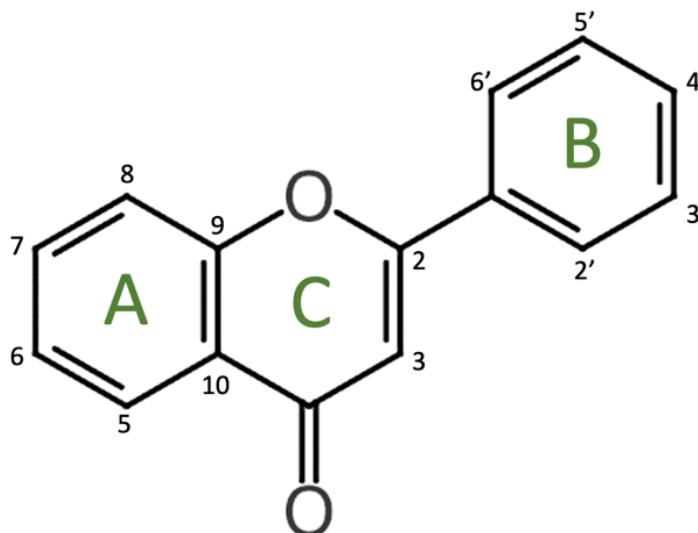
O termo bufadienolídeo faz referência ao gênero *Bufo* ou *Bufo*nidae, de espécies de sapos, devido à presença destes compostos na secreção da pele desses animais. Além dos sapos, espécies de cobras e de plantas, como as da família Crassulaceae, sintetizam glicosídeos cardioativos do tipo bufadienolídeos (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016). As atividades biológicas mais relatadas para esta classe de substâncias são as atividades cardiotônicas e antitumorais. Espécies do gênero *Kalanchoe* são conhecidas por produzir glicosídeos cardioativos do tipo bufadienolídeos com diversas características estruturais, incluindo vários tipos de moléculas de açúcares e formas de ortoacetato. Essas substâncias foram relatadas principalmente em *K. daigremontiana*, *K. delagoensis*, *K. pinnata*, *K. ceratophylla*, *K. tomentosa* e *K. lanceolata* (Oufir *et al.*, 2015; Bachmann *et al.*, 2017; Nascimento; Casanova; Costa, 2023).

Em relação aos ácidos fenólicos, há presença tanto de ácidos fenólicos esterificados (como os ácidos clorogênico e rosmarínico) quanto de ácidos livres, como os ácidos hidroxicinâmicos (principalmente os ácidos cafeico e *p*-cumárico) (Elansary *et al.*, 2018; Hegazy *et al.*, 2021). Exemplos de ácidos fenólicos encontrados em espécies do gênero *Kalanchoe* são: ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *c*-resorcílico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *b*-rosorcílico, ácido siríngico e ácido protocatecuico (Bogucka-Kocka *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2013).

A classe de metabólitos secundários que apresenta notável relevância para o gênero é a dos flavonoides, caracterizados quimicamente como substâncias

compostas por um esqueleto básico do tipo C6-C3-C6, caracterizando três anéis A, B e C (**Figura 06**) (Simões *et al.*, 2017).

Figura 06 – Núcleo fundamental dos flavonoides



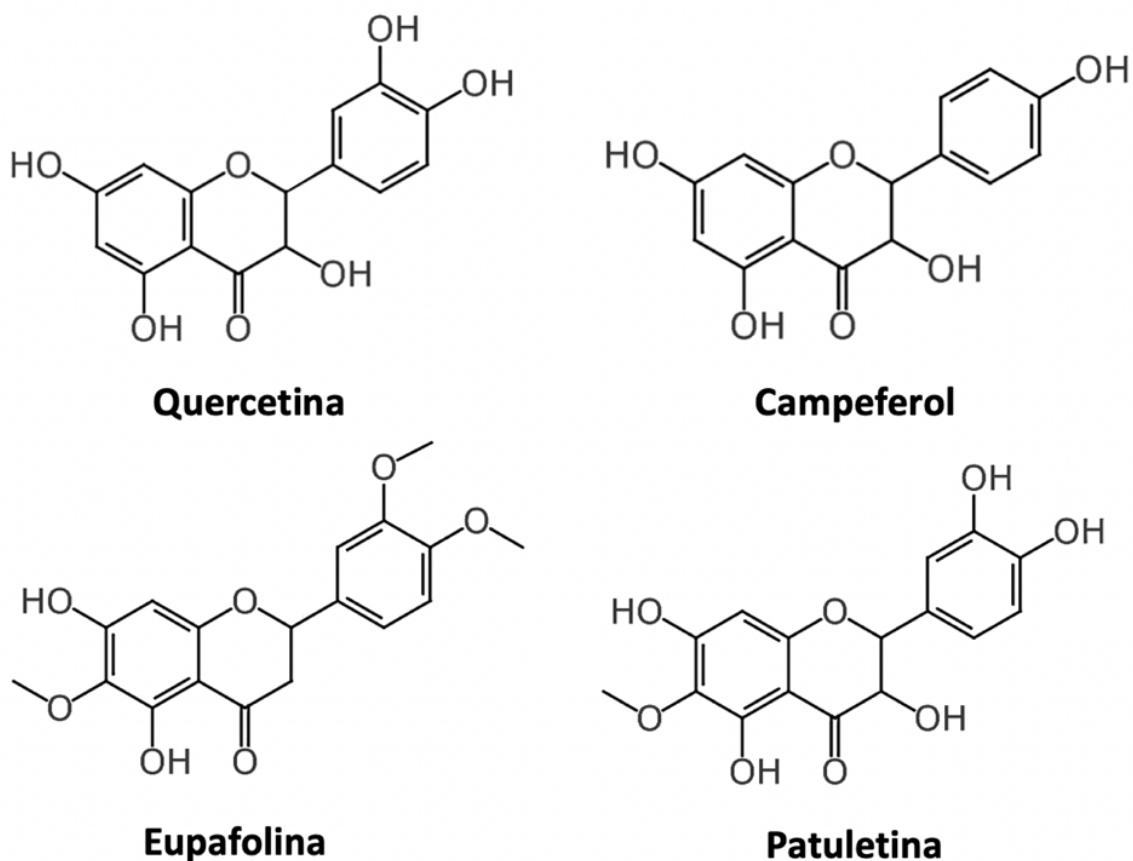
Fonte: a autora.

Os flavonoides foram identificados pela primeira vez no gênero *Kalanchoe* na década de 1970, evidenciando a presença de glicosídeos de quercetina e campeferol em extratos de folhas de *K. pinnata* (Nascimento; Casanova; Costa, 2023).

Os flavonoides também já foram identificados em extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos (metanólico) das folhas de *K. ceratophylla*, *K. spathulata*, *K. gastonis-bonnierii*, *K. delagoensis*, *K. mortagei*, *K. fedtschenkoi*, *K. blossfeldiana*, *K. daigremontiana*, *K. pinnata*, *K. brasiliensis*, *K. marmorata* e *K. crenata* (Andrade *et al.*, 2023).

Entre os flavonoides descritos no gênero *Kalanchoe*, os derivados glicosilados de quercetina, campeferol, eupafolina e patuletina (**Figura 07**) são os mais comuns (Elansary *et al.*, 2018; Nascimento; Casanova; Costa, 2023). Considerando os flavonoides bioativos do gênero, os glicosídeos de quercetina são os mais citados. De fato, várias espécies de *Kalanchoe* têm derivados de quercetina como compostos responsáveis pelas atividades antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, gastroprotetoras, imunomoduladoras, de cicatrização de feridas e neuroprotetora (Nascimento; Casanova; Costa, 2023).

Figura 07 – Flavonoides mais descritos para o gênero *Kalanchoe*.

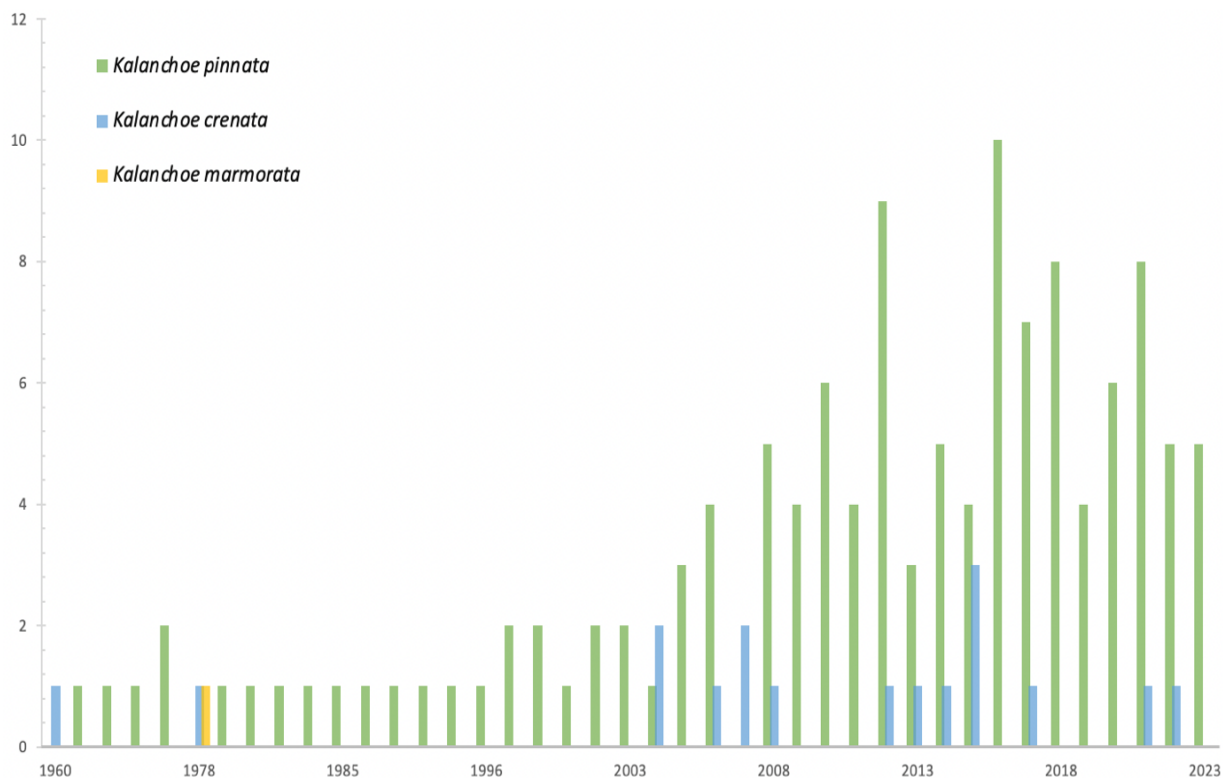


Fonte: a autora.

3.3.1 *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw., *Kalanchoe marmorata* Baker e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Dentre as espécies do gênero, destacam-se três espécies, *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw., *Kalanchoe marmorata* Baker e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., por seus amplos usos populares e divergências em relação a produção de evidências científica, uma vez que a espécie *K. pinnata* apresenta, notadamente, mais estudos publicados do que as demais (**Figura 08**).

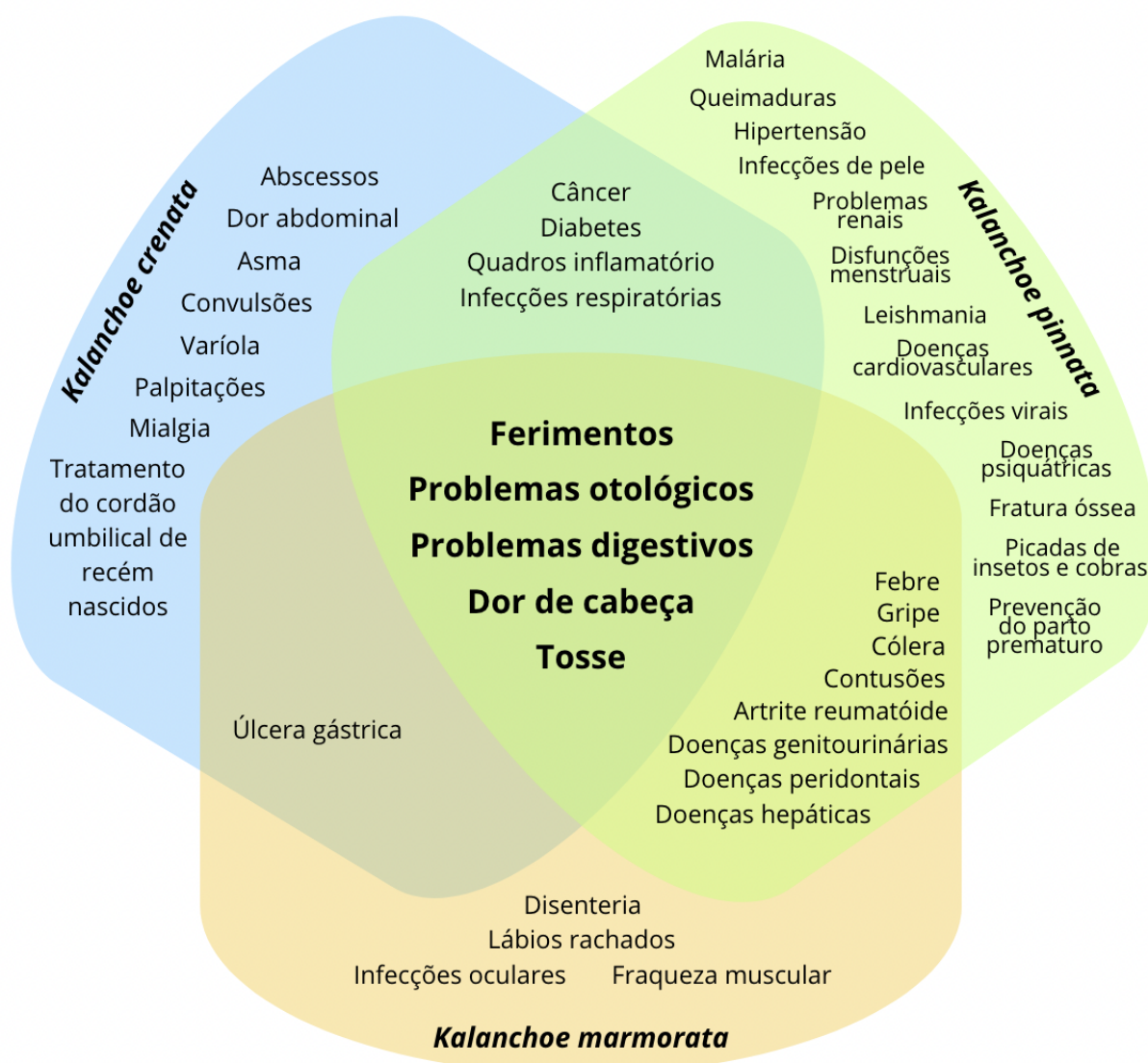
Figura 08 – Publicações por ano das espécies *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: a autora.

Essas espécies são utilizadas popularmente principalmente para o tratamento de diversos tipos de enfermidades (**Figura 09**) (Andrade *et al.*, 2023). Porém cada uma delas apresenta singularidades, abrangendo o uso, suas características anatômicas, constituição química e ação biológica.

Figura 09 – Principais usos populares das espécies *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: a autora.

Especificando cada uma delas, a espécie *K. crenata* apresenta folhas suculentas e crenadas, com bordas dentadas de tons verde-azulados ou de cor roxa quando expostas à luz solar. Além de ser utilizada ornamentalmente, *K. crenata* é reconhecida por suas aplicações na medicina popular, onde extratos das folhas são usados para tratar condições como quadros inflamatórios, dores, ferimentos e abscessos (Andrade *et al.*, 2023).

Dentre as atividades biológicas relatadas para *K. crenata* destacam-se as propriedades analgésicas e anticonvulsivantes, as quais foram avaliadas nos extratos aquoso, etanólico, hexânico, de acetato de etila e de cloreto de metileno/metanol (1:1,

v:v) das folhas secas pelos ensaios de dor induzida por ácido acético, formalina e por pressão em modelo animal de ratos. Os resultados sugeriram a presença de atividades analgésicas periféricas e centrais, juntamente com um efeito anticonvulsivante (Nguelefack *et al.*, 2004; Nguelefack *et al.*, 2006). Outra atividade de relevante investigação é a ação antidepressiva, já avaliada por meio de experimentação animal com ratos através dos testes de suspensão da cauda, de nado forçado e avaliação do envolvimento dos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos. Este estudo demonstrou que o extrato de *K. crenata* induziu um declínio na imobilidade, indicativo de efeito semelhante ao antidepressivo e aumentou as pontuações de natação, sugerindo possível interação com os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos. (Kukuia *et al.*, 2015).

Esta espécie apresenta nos extratos das folhas e do caule, a depender do solvente extrator, compostos como esteroides, fenólicos (flavonoides e taninos), alcaloides, antraquinonas e saponinas (Effah-Yeboah *et al.*, 2021; Nguelefack *et al.*, 2006). Os extratos de *K. crenata* apresentam, ainda, microelementos importantes que podem ser coadjuvantes aos metabólitos secundários que exercem atividade terapêutica, entre eles estão o cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco e vitaminas ácido ascórbico, riboflavina e tiamina (Sahin *et al.*, 2019).

Entretanto, não há publicações referentes à identificação de metabólitos secundários presentes nos extratos de *K. crenata*.

No caso da espécie *Kalanchoe marmorata*, conhecida mundialmente como a planta *penwiper*, é nativa da Etiópia, Eritreia e Sudão e é muito utilizada como planta ornamental. As suas folhas são grandes, ovais, de cor azul-esverdeada, com manchas roxas, estas tornando-se mais brilhantes durante o verão e sob a forte incidência solar (Akulova-Barlow, 2009; Smith *et al.*, 2019).

Esta espécie apresenta uma menor gama de usos populares e consequentemente não há na literatura estudos relacionados à sua atividade biológica. Porém, há relatos de uso para tratar feridas, furúnculos, contusões, doença periodontal, lábios rachados, artrite, úlceras gástricas, doenças do ouvido, infecções oculares, disenteria, febre, resfriado comum, tosse, cólera, doenças urinárias, músculos rígidos, problemas hepáticos e dores de cabeça (Andrade *et al.*, 2023). Em relação à sua composição química, foram identificados quatro flavonoides (**Tabela 01**), havendo necessidade de maior aprofundamento (Singab *et al.*, 2011).

A espécie *Kalanchoe pinnata* é uma das mais utilizadas na medicina tradicional, sendo conhecida como “saião”, “planta da vida”, “planta da fortuna”, “folha de pirarucu”, incluída na Lista Nacional de Plantas de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) e amplamente prescrita na medicina antroposófica como tratamento para insônia e distúrbios emocionais, justificando seu interesse na pesquisa científica (Nascimento; Casanova; Costa, 2023).

Kalanchoe pinnata caracteriza-se por ser uma planta ereta, suculenta, perene e glabrosa que cresce até 1,5 m de altura. As folhas verde-escuras frescas, simples, opostas, ovadas ou elípticas, têm margens serradas-crenadas, um ápice obtuso, base assimétrica, venação reticulada e pecíolo longo. As flores são pendentes, escuras e semelhantes a sinos. As hastes são altas, ocas, obtusos e de quatro ângulos. Os frutos estão fechados no cálice e na corola (Andrade *et al.*, 2023).

Com relação a descrição de suas características morfoanatômicas, tem-se: camada epidérmica fina, com pequenas células proeminentes no lado adaxial e menos distintas no lado abaxial, tecido da nervura parenquimatoso e homogêneo, feixe vascular único, colateral e hemisférico; apresenta estômatos do tipo anisocítico e cristais prismáticos de oxalato de cálcio incorporados em células parenquimatosas no pecíolo foliar (Andrade *et al.*, 2023).

Em relação às várias atividades biológicas já avaliadas, pontuam-se atividades relacionadas ao SNC. A atividade anticonvulsivante de *K. pinnata* foi estudada em extratos metanólicos de caules e raízes. Como resultado obteve-se redução das convulsões com o aumento das doses. Além disso, a dose de 400 mg/kg melhorou significativamente a memória e o aprendizado de camundongos (Mora-Pérez *et al.*, 2016; Bhandari *et al.*, 2021). Um estudo utilizando um modelo de peixe-zebra larval foi realizado para avaliar o potencial de extrato aquoso obtido a partir das folhas de *K. pinnata*, tendo indicado que o extrato exibiu efeitos ansiolíticos e psicoativos, também de maneira dose-dependente (Pereira *et al.*, 2022). Assim, estes estudos contribuem para uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes responsáveis por esses efeitos neurológicos.

K. pinnata possui em sua composição principalmente ácidos cinâmicos, flavonoides e seus glicosídeos. Já foram descritos 24 compostos das classes dos flavonoides (**Tabela 01**), entre eles: quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (quercetina arabinopiranosil ramnopiranosídeo–QAR), miricetina-3-

O-ramnosídeo (miricitrina) e quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina)
(Pereira *et al.*, 2022)

Tabela 01 – Substâncias identificadas nas espécies *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.

(continua)

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Kalanchoe marmorata</i>	isoramnetina-3-O- α -L-1C4- 23 ramnopiranosideo	SINGAB <i>et al.</i> , 2011.
	quercetina	
	4'-metoxi-miricetina-3-O- α -L-1C4- ramnopiranosideo	
	quercetina-3-O- β -D-4C1-glucopiranosideo	
<i>Kalanchoe pinnata</i>	protocatechuic-4O- O-b-D-4C1-glucopiranosideo	MUZITANO <i>et al.</i> , 2006; MUZITANO <i>et al.</i> , 2011; CRUZ <i>et al.</i> , 2012; COUTINHO <i>et al.</i> , 2012; TATSIMO <i>et al.</i> , 2012; FURER <i>et al.</i> , 2013; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2013; CHIBLI <i>et al.</i> , 2014; FERREIRA <i>et al.</i> , 2014; DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2018; FERNANDES <i>et al.</i> , 2019; STEFANOWICZ- HAJDUK <i>et al.</i> , 2020; HEGAZY <i>et al.</i> , 2021.
	quercetina	
	quercetina 3-O- β -glucosideo (quercetina 3-O- glucosideo; isoquercetina; isoquercetrina)	
	quercetina 3-O- β -D-glucuronopiranosideo (miquelianina)	
	quercetina 3-O-rhamnoside (quercitrina)	
	quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (QAR)	
	quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo-7-O- β -D-glucopiranosideo	
	quercetina 3-O-rutinoside (rutina)	
	campeferol	
	campeferol 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α - L- ramnopiranosideo (campeferol 3-O- xilosil-ramnosideo)	
	campeferol 3-rutinoside (nicotiflorina)	
campeferol 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L- ramnopiranosideo (capinatosideo)		
campeferol 3-O- α -L-(2-O- acetil) ramnopiranosideo 7-O- α -L- ramnopiranosideo		
campeferol 3-O- α -L-(3-O- acetil) ramnopiranosideo 7-O- α -L- ramnopiranosideo		
campeferol 3-O- α -L-(4-O- acetil) ramnopiranosideo 7-O- α -L- ramnopiranosideo		

Tabela 01 – Substâncias identificadas nas espécies *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.

ESPÉCIE	SUBSTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Kalanchoe pinnata</i>	campeferol 3-O- α -D-glucopiranosideo 7-O- α - L-ramnopiranosideo	MUZITANO <i>et al.</i> , 2006;
	afzelina (campeferol 3-O- α -L- ramnopiranosideo)	MUZITANO <i>et al.</i> , 2011;
	α -ramnoisorobina (campeferol 7-O- α -L- ramnopiranosideo)	CRUZ <i>et al.</i> , 2012;
	4',5-dihydroxy-3',8-dimethoxyflavone 7-O- β - D-glucopiranosideo	COUTINHO <i>et al.</i> , 2012;
	miricetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L- ramnopiranosideo	TATSIMO <i>et al.</i> , 2012;
	miricetrina (miricetina 3-O- α -L- ramnopiranosideo)	FURER <i>et al.</i> , 2013;
	diosmina (diosmetina 7-O- α -L- ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosideo)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2013; CHIBLI <i>et al.</i> , 2014;
	acacetina 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosideo	FERREIRA <i>et al.</i> , 2014;
	luteolina	DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2018;
luteolina 7-O- β -D-glucosideo	FERNANDES <i>et al.</i> , 2019;	
		STEFANOWICZ- HAJDUK <i>et al.</i> , 2020;
		HEGAZY <i>et al.</i> , 2021.

Fonte: a autora.

Além das atividades acima citadas para as espécies do gênero *Kalanchoe*, uma quantidade crescente de pesquisas está sendo dedicada a avaliação do potencial dessas espécies frente a redução dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Há evidências consideráveis de que os EROs induzem comprometimento em biomoléculas. Os antioxidantes, que eliminam os radicais livres, são conhecidos por desempenhar papéis importantes na prevenção de doenças reativas induzidas por tais espécies (Bogucka-Kocka *et al.*, 2018).

A predominante capacidade antioxidante encontrada nas plantas é frequentemente atribuída às propriedades redox inerentes aos compostos fenólicos, os quais desempenham o papel de doadores de hidrogênio e agentes redutores. A ação antioxidante dos polifenóis é manifestada através de uma série de mecanismos distintos. Esses componentes atuam como eficazes agentes redutores, demonstram habilidades na neutralização de radicais livres e na formação de complexos quelantes com íons metálicos. Além disso, desempenham funções como cofatores de enzimas que conduzem reações oxidativas, inibem a atividade de oxidases, interrompem reações em cadeia provocadas por radicais e proporcionam estabilização de radicais livres (Bogucka-Kocka *et al.*, 2018).

Neste âmbito, estas três espécies de *Kalanchoe* se destacam, tendo duas delas, *K. pinnata* e *K. crenata* exibido atividades antioxidantes significativas. O potencial antioxidante de vários extratos de *K. pinnata* foi avaliado e atividade antioxidante significativa dependente da dose foi demonstrada em todos eles. As atividades antioxidantes dos extratos etanólicos das folhas e caule foram avaliadas pelo método de inibição do radical DPPH[•]. Além deste ensaio, estudou-se o potencial da espécie em avaliações *in vitro*: ensaio de lipoperoxidação, de captura do óxido nítrico, captura de radicais hidroxil, radical superóxido; e *in vivo*: dosagem de glutathione, de malondialdeído, da atividade da mieloperoxidase, da superóxido dismutase e da catalase. Ademais, para a espécie *K. crenata* somente ensaio *in vivo* foram realizados, os quais também indicaram a ação antioxidante de extrato metanólico (**Tabela 02**).

O mecanismo antioxidante pelo qual estes compostos agem, assim como suas interações com enzimas específicas, como receptores GABA_a, pode estar relacionado aos efeitos no SNC: neuroproteção, ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante apresentado pelas espécies avaliadas (Pereira *et al.*, 2022).

Tabela 02 – Atividade antioxidante relatada nas espécies *Kalanchoe crenata* e *Kalanchoe pinnata*.

(continua)

ESPÉCIE	PARTE USADA E EXTRATO	ENSAIO	RESULTADO	REFERÊNCIA
<i>Kalanchoe crenata</i>	Planta inteira/Extrato metanólico	Dosagem de malondialdeído (MDA)	Reduziu o nível de MDA em 34 - 44%	FONDJO <i>et al.</i> , 2012.
		Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	Aumentou os níveis de SOD em 116 - 257%	
		Avaliação da atividade da catalase (CAT)	Aumentou os níveis de CAT em 78 - 176%	
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Folhas/Extrato etanólico	Ensaio de lipoperoxidação	Cl ₅₀ = 134,56 µg/mL	MOHAN <i>et al.</i> , 2012.
		Ensaio de captura do óxido nítrico (NO [•])	Cl ₅₀ = 1320,84 µg/mL	
		Ensaio de captura de radicais hidroxil	Cl ₅₀ = 4,64 µg/mL	
	Folhas/Extrato etanólico	Ensaio do radical superóxido	Cl ₅₀ = 51,3 ± 0,6 µg/mL	BOGUCKA-KOCKA <i>et al.</i> , 2018.
		Redução do radical DPPH [•]	Cl ₅₀ = 90,6 µg/mL	
	Folhas/Extrato aquoso	Dosagem de glutathiona (GSH)	Aumentou significativamente os níveis de GSH em doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg.	DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2018.
		Dosagem de malondialdeído (MDA)	Doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente os níveis de MDA.	
Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)		Dose de 500 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a atividade enzimática da MPO.		
Caule/Extrato etanólico	Redução do radical DPPH [•]	Porcentagem de inibição de 40,14% (30 µg/mL).	KENDERSON <i>et al.</i> , 2021.	

Tabela 02 – Atividade antioxidante relatada nas espécies *Kalanchoe crenata* e *Kalanchoe pinnata*.

(conclusão)

ESPÉCIE	PARTE USADA E EXTRATO	ENSAIO	RESULTADO	REFERÊNCIA
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Folhas/Extrato etanólico	Redução do radical DPPH•	Porcentagem de inibição de 49,5% ± 5,6 (2000 µg/mL).	QUINTERO <i>et al.</i> , 2012.
		<i>Ensaio</i> de captura do óxido nítrico (NO•)	Porcentagem de inibição de 24,3% ± 0,9 (62,5 µg/mL).	
		Ensaio do radical superóxido	Porcentagem de inibição de 17,9% ± 2,6 (62,5 µg/mL).	
	Folhas/Extrato éter de petróleo	Redução do radical DPPH•	Porcentagem de inibição de 28,9% ± 11,6 (500 µg/mL).	QUINTERO <i>et al.</i> , 2012.
		<i>Ensaio</i> de captura do óxido nítrico (NO•)	Porcentagem de inibição de 7,2% ± 2,0 (125 µg/mL).	
	Folhas/Extrato aquoso	Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	Aumentou os níveis de SOD.	RAMON <i>et al.</i> , 2023.
		Avaliação da atividade da catalase (CAT)	Aumentou efetivamente a atividade do CAT.	
		Dosagem de glutathiona (GSH)	Promoveu concentrações mais altas de glutathiona reduzida.	
		Dosagem de malondialdeído (MDA)	Reduziu significativamente as concentrações de MDA.	

Fonte: a autora.

3.4 TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA

A ansiedade pode ser uma resposta adequada a situações estressantes, mas é considerada um transtorno patológico quando é incapacitante e difícil de controlar (Demartini *et al.*, 2019). O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é um estado persistente de ansiedade que dura pelo menos 6 meses, considerado uma condição psiquiátrica incapacitante que engloba várias doenças concomitantes (Rocha *et al.*, 2022).

Pacientes com TAG apresentam redução da satisfação global com a vida e menor qualidade de vida relacionada à saúde, geralmente manifestam sintomas somáticos que podem se expressar de modo diferente a depender do indivíduo, mas sempre apresentando como nucleares a preocupação e ansiedade crônicas e generalizadas, acompanhadas de sintomas físicos e psicológicos inespecíficos: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular ou distúrbios do sono como insônia (**Figura 10**). Pacientes com TAG têm risco aumentado de suicídio, bem como eventos cardiovasculares e morte (Demartini *et al.*, 2019; Stahl., 2021; Borrás *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2022).

Figura 10 – Sintomas do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG).



Fonte: a autora.

O TAG é o transtorno de ansiedade mais comum observado na atenção primária, afetando aproximadamente 4% a 7% dos adultos americanos, sendo duas vezes mais comum em mulheres do que em homens. Fatores de risco adicionais incluem transtornos psiquiátricos comórbidos, história de abuso de substâncias psicoativas ou trauma e história familiar de TAG (Demartini *et al.*, 2019).

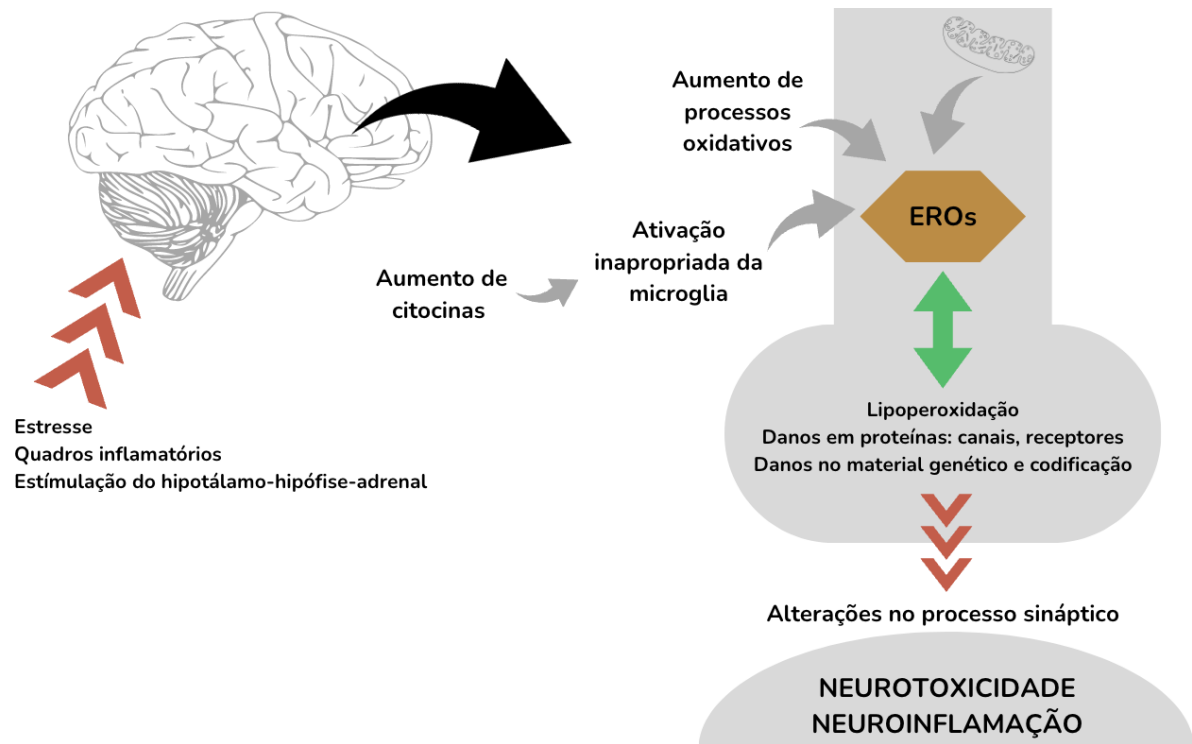
A fisiopatologia do TAG é significativamente afetada por baixos níveis de ácido gama aminobutírico (GABA) e neurotransmissão excitatória de glutamato. Os receptores GABA_a estão especialmente concentrados no córtex pré-frontal medial, na amígdala e no hipocampo, todos envolvidos em respostas de ansiedade e medo (Borrás *et al.*, 2021).

Sabe-se que a função cerebral depende de interações coordenadas entre neurônios e células gliais e que alterações no funcionamento dessas células estão presentes em diferentes quadros que ocorrem em nível de SNC, como por exemplo, a ansiedade. Nesse aspecto, linhas convergentes de evidência indicam que a neuroinflamação está altamente associada ao desenvolvimento de várias doenças neuropsiquiátricas (Zheng *et al.*, 2021).

A neuroinflamação ocorre a partir da ativação do sistema imunológico estimulando astrócitos e células microgliais, que por sua vez produzem citocinas em níveis crescentes. Nessa condição, a micróglia, além de liberar mediadores inflamatórios, também secreta glutamato, principal neurotransmissor excitatório. Porém, os astrócitos parecem não ser capazes de absorver o excesso de glutamato, levando ao desenvolvimento de quadros neuropsiquiátricos. Ademais, essas citocinas inflamatórias podem levar coletivamente a danos neuronais (Troubat *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2021).

Há a recente sugestão que a neuroinflamação pode não apenas derivar de condições patológicas, mas também que pode agravar com estímulos estressantes. Uma vez que, o estresse oxidativo pode alterar a neurotransmissão, a função neuronal e a atividade cerebral geral e, assim, contribuir para a indução da ansiedade. (**Figura 11**) (Kim; Jeon, 2018).

Figura 11 – Processos que contribuem para a neuroinflamação.



Fonte: a autora.

Tratamentos eficazes para TAG incluem psicoterapia e farmacoterapia, como inibidores seletivos de recaptção de serotonina. Porém os fármacos apresentam uma gama de efeitos colaterais e a fim de minimizar estes efeitos e a dependência causada pelos medicamentos sintéticos, a medicina popular emprega a utilização de medicamentos ou produtos fitoterápicos (Bortoluzzi *et al.*, 2019).

Sabendo que o TAG está relacionado a diversos aspectos e alterações SNC, plantas medicinais possuem inúmeras substâncias capazes de diminuir atividades que desencadeiam em crises de ansiedade. Dentre elas a ação ansiolítica de alguns flavonoides, capaz de modular vias cruciais para o tratamento de transtornos psiquiátricos (Rocha *et al.*, 2022). Dessa forma, a exploração de novos medicamentos direcionados ao tratamento da ansiedade é uma grande preocupação em todo o mundo. As plantas medicinais estão sendo usadas como uma fonte potencial de novos medicamentos para transtornos de ansiedade (Bortoluzzi *et al.*, 2019; Borrás *et al.*, 2021).

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que alcaloides, terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas possuem efeitos ansiolíticos (Bortoluzzi *et al.*, 2019; Borrás *et al.*, 2021; Cordeiro *et al.*, 2022).

Dentre esses compostos, os ácidos fenólicos se destacam pela sua eficácia como agentes ansiolíticos e antidepressivos (Cordeiro *et al.*, 2022). Por exemplo, o ácido elágico e o ácido caféico demonstraram efeito ansiolítico comparável ao do diazepam em ratos (Girish, C. *et al.*, 2013; Monteiro *et al.* 2020). Além disso, em revisão de Wang *et al.* (2023) foram relatados os flavonoides que promovem efeitos ansiolíticos associados com a modulação de neurotransmissores, como apigenina e quercetina. Essas descobertas enfatizam o potencial terapêutico metabólitos secundários presentes em plantas medicinais no tratamento de distúrbios neuropsicológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Partes vegetativas aéreas de três espécies do gênero *Kalanchoe* foram coletadas na região dos Campos Gerais, Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°5'38"S 50°12'34"O). As plantas floridas foram utilizadas para o preparo de exsicatas, sendo identificadas pela botânica Dr^a. Rosângela Capuano Tardivo, curadora do Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUPG) como *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw., *Kalanchoe marmorata* Baker e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., e os representantes depositados no HUPG sob números de registro 22929, 22779 e 23063, respectivamente. Os acessos aos materiais botânicos foram registrados junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o cadastro AFDD6B4.

4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O processo extrativo ocorreu pelo método de turbólise. As folhas foram colhidas, pesadas e trituradas juntamente com água, na proporção 10% (p/v). Após o preparo, os extratos obtidos foram filtrados, liofilizados e armazenados sob refrigeração (5° C) até o momento do uso. O processo extrativo foi realizado no Laboratório de Fitoterapia, Tecnologia de Fitoterápicos e Química de Produtos Naturais e o processo de liofilização ocorreu no Complexo de Laboratórios Multiusuário (C-LABMU), ambos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.3 ENSAIOS FARMACOBOTÂNICOS

Amostras de partes aéreas (folhas e caules) das espécies de *Kalanchoe* coletadas foram fixadas por 5 dias em solução de formol, ácido acético e álcool (FAA 70) (Johansen, 1940). Após, foram lavadas com água destilada e posteriormente armazenadas em etanol a 70% (Berlyn; Miksche, 1976). Para o exame microscópico do material vegetal foram elaboradas secções paradérmicas e transversais à mão livre. Esses materiais foram submetidos à coloração com azul de Astra e fucsina básica (Roeser, 1972) e com azul de toluidina (O'Brien; Feder; Mccully, 1964) para obtenção de lâminas semipermanentes, as quais foram montadas em lâminas de

vidro, com glicerina a 50 %.

4.4 TESTES HISTOQUÍMICOS

As análises histoquímicas foram realizadas através de secções transversais à mão livre, a partir do material estocado. As principais classes de metabólitos secundários foram investigadas utilizando os reativos: floroglucina clorídrica para identificar tecidos e elementos lignificados (Sass, 1951), Sudam III para observar a presença de substâncias lipofílicas (Foster, 1949), solução de cloreto férrico a 2% (Johansen, 1940) e dicromato de potássio a 10% (Gabe, 1968) para detectar compostos fenólicos, solução de azul de metileno 1% para compostos mucilaginosos (Oliveira; Akissue; Akissue, 2014) e lugol a 1% para identificar a presença de amido (Berlyn; Miksche, 1976). As lâminas semipermanentes e histoquímicas foram imediatamente fotografadas e analisadas em microscópio óptico acoplado a câmera fotográfica (modelo Olympus CX31 com unidade de controle C 7070), para descrição detalhada da anatomia foliar e caulinar. As análises farmacobotânicas e histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da UEPG.

4.5 ANÁLISE QUÍMICA

4.5.1 Análises CLUE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Shimadzu® modelo Nexera-i LC-2040C acoplado detector ultravioleta (UV) do tipo arranjo de diodos (DAD). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Acquity UPLC® BEH3000 C18 1,7 µm, 2,1 x 100 mm com 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) (A) e 0,01% de ácido fórmico em metanol (v/v) (B) como uma fase móvel binária. Todas as amostras foram analisadas usando um programa de eluição gradiente, começando em 5% B, aumentando para 100% B ao longo de 12 minutos, mantendo-o por 3 minutos e, em seguida, retornando as condições iniciais. A taxa de fluxo foi ajustada em 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 4 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 30° C. Os *scans* dos comprimentos de onda foram obtidos em 360 nm.

4.5.2 Quantificação do teor de compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos totais seguiu o método do reagente Folin-Ciocalteu (Hills; Swain, 1959). Inicialmente, os extratos foram preparados em concentração de 1 mg/mL e então, foram transferidos 0,5 mL da amostra para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 6,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica®). Após 30 segundos, completou-se o volume com 2,5 mL de Na₂CO₃ a 10,6 %, seguido de um período de incubação de 5 min a 50°C e medida da absorbância a 715 nm. Foi preparada uma curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de ácido gálico (0,9 a 0,02 mg/mL) derivadas de uma solução estoque (1 mg/mL). Os dados obtidos na análise foram expressos em mg equivalente a ácido gálico/g de extrato (mgEqAG/g). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3 Quantificação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Herald, Gadgil e Tilley (2012). Os extratos aquosos foram preparados em concentração de 1 mg/mL e então, foram adicionados 25 µL dos extratos, 10 µL de NaNO₂ a 5% (m/v) e 100 µL de água destilada em poço de uma placa de 96 poços. Após 5 minutos, adicionaram-se 25 µL de AlCl₃ a 0,414 mol/L. Após 5 minutos, adicionaram-se 50 µL de NaOH 1 mol/L. Por fim, após 5 minutos, a absorbância foi lida em 510 nm. O conteúdo total de flavonoides foi calculado a partir da curva analítica do padrão de catequina (500-20µg/mL). Os dados obtidos na análise foram expressos em mg equivalente a catequina/g de extrato (mgEqCQ/g). A quantificação de flavonoides foi realizada em triplicata.

4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

4.6.1 Redução do radical DPPH[•]

O ensaio de antioxidante pelo método da redução do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) seguiu a metodologia de Soares *et al.* (1997), no qual foram adicionados 300 µL das amostras, em diferentes concentrações a serem testadas, e acrescentados 300 µL da solução de DPPH[•] em cada tubo. Após 15 minutos de reação

na ausência de luz, 200 μ L das amostras foram transferidos para uma placa de 96 poços para a determinação da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis, sob comprimento de onda de 517 nm. As amostras foram testadas em triplicata e utilizou-se quercetina como padrão.

4.6.2 Redução do radical ABTS^{•+}

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Pellegrini *et al.* (1999). O cátion ABTS^{•+} foi gerado através da mistura prévia de 5 mL de solução-estoque de ABTS^{•+} com 88 μ L de solução de persulfato de potássio, a qual foi mantida em repouso no escuro sob refrigeração durante 12h e, após este período, foi diluída em solução tampão 10 mM. Para o ensaio, adicionou-se 300 μ L das amostras a serem testadas e 300 μ L da solução de ABTS^{•+} em cada tubo. Após 30 minutos de reação na ausência de luz, 200 μ L das amostras foram transferidas para placa de 96 poços para a determinação da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis, sob comprimento de onda de 734 nm. As amostras foram testadas em triplicata e como padrão utilizou-se quercetina.

4.6.3 Capacidade de absorção do radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC*)

Para realização do ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Denev *et al.* (2010), na qual a reação foi realizada em tampão fosfato 75 mM (pH 7,0) e a mistura final da reação foi de 200 μ L. Inicialmente, foram adicionados 100 μ L da solução de fluoresceína em todos os poços e lida a fluorescência somente uma vez. Então foram adicionados 50 μ L das amostras em triplicata, as quais foram incubadas a 37o C por 3 minutos. Depois, foram adicionados 50 μ L da solução de AAPH (dicloridrato de 2,2,-azobis(2-metilpropionamida)) rapidamente usando uma pipeta multicanal. A microplaca foi imediatamente colocada no leitor e a fluorescência registada a cada minuto durante 80 minutos. Um branco usando tampão fosfato e 5 soluções de calibração usando Trolox (concentração final de 0,02-0,1 mmol) como antioxidante também foram utilizadas em cada ensaio.

4.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA PERFORMANCE (CCD-AP) (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC)

4.7.1 Preparo de amostras e padrões

Foram preparadas soluções de 10 mg/mL (em água) de cada extrato. Para cada padrão (quercetina, rutina, ácido clorogênico e campeferol), foram preparadas soluções contendo 2 mg de cada composto em 10 mL de metanol, e as concentrações finais foram ajustadas para 0,4 mg/mL para rutina, 0,2 mg/mL para ácido clorogênico, quercetina e campeferol. Para o teste de Adequação do Sistema (*System Suitability Test*, SST), soluções individuais de padrões foram preparadas em metanol (1,0 mg/mL), com concentração final ajustada para 0,5 mg/mL para guanosina e 1,0 mg/mL para timidina e 9-hidroxi fluoreno.

4.7.2 Aplicação e desenvolvimento

Foram utilizadas placas de sílica gel de 20 x 10 cm (comprimento x altura). O volume aplicado foi de 10 µL. A fase móvel utilizada é composta de acetato de n-butila:metanol:água:ácido fórmico (7,5:2:1:1, v:v:v:v).

4.7.3 Derivatização

Para a análise do *fingerprint* do extrato aquoso de cada espécie e produto comercial de *K. pinnata*, foi utilizada uma combinação de reagente de Produtos Naturais (PN) com Anisaldeído. Para o preparo do reagente PN, 1 g de 2-aminoetil difenil borinato foi dissolvido em 200 mL de acetato de etila. Este reagente foi aplicado na placa por um Sistema de Imersão (CAMAG® *Immersion device*), sob condições de tempo 0 e velocidade 3, com aquecimento da placa antes da imersão (3 minutos; 100°C). Para o preparo do reagente Anisaldeído, 85 mL de metanol foi adicionado vagorosamente, com 10 mL de ácido acético e 5 mL de ácido sulfúrico. Após isso, foi adicionado 0,05 mL de anisaldeído (p-metoxi benzaldeído). O volume de 3 mL desta solução reagente foi dispersado (por *spray*) no topo da placa previamente derivatizada com o reagente PN, por meio de um Sistema de Derivatização (Camag® *Derivatizer device*), com bocal azul e nível 3, com aquecimento da placa após a aplicação por *spray* (3 minutos; 100 °C). Em seguida, a placa foi submetida à obtenção de imagens

nos comprimentos de onda 254 nm, 366 nm, e sob Luz branca, no equipamento visualizador de placas (CAMAG® TLC Visualizer).

Para a análise de fenólicos totais de cada extrato aquoso foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, o qual foi diluído 1:10 em metanol. Este reagente foi aplicado na placa por um Sistema de Imersão (CAMAG® *Immersion device*), sob condições de tempo 0 e velocidade 5. Após 30 minutos, a placa foi submetida à obtenção de imagens sob Luz branca, no equipamento visualizador de placas (CAMAG® *TLC Visualizer*).

Para a análise do potencial antioxidante de cada extrato aquoso, foram utilizados os reagentes DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). O reagente DPPH foi preparado na concentração de 0,05% (em metanol). O volume de 3 mL desta solução foi disperso no topo da placa, por meio do Sistema de Derivatização (Camag® *Derivatizer device*), com bocal azul e nível 3. Após a derivatização, a placa foi mantida protegida da luz por 30 minutos. para então ser submetida à obtenção de imagens sob Luz branca, no equipamento visualizador de placas (CAMAG® *TLC Visualizer*). O reagente ABTS foi preparado na concentração de 0,04% (em água) e posteriormente diluído 50:50 (em metanol). O volume de 3 mL desta solução foi disperso no topo da placa, por meio do Sistema de Derivatização (Camag® *Derivatizer device*), com bocal amarelo e nível 3. Após 30 minutos., a placa foi submetida à obtenção de imagens sob Luz branca, no equipamento visualizador de placas (CAMAG® *TLC Visualizer*).

4.7.4 Cromatografia em camada delgada acoplada a espectrometria de massas (CCD-EM)

Bandas selecionadas de cada amostra foram coletadas numa interface de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) capaz de extrair bandas de interesse a serem analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM) (CAMAG® *TLC-MS Interface*). A análise por CLUE-EM foi realizada em sistema Waters® *I-Class UPLC* acoplado a um Espectrômetro de Massas Waters® *G2-XS Quadrupole Time of Flight (Q-TOF)*. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 1.7 µm, 2.1 x 100 mm, com 0,1% ácido fórmico em água (v/v) (solvente A) e 0,01% ácido

fórmico em acetonitrila (solvente B) em modo gradiente. O volume de injeção foi de 3 μ L e o fluxo de 0,5 mL/min, com uma corrida de 10 minutos, utilizando Ionização (*Electrospray ionization*, ESI) nos modos positivo e negativo. A faixa de íons selecionada foi de 60-1500 m/z (razão massa carga).

4.8 ANÁLISE CLUE-EM

O perfil de metabólitos de extratos aquosos de espécies foi realizado usando um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência Waters[®] acoplado com um Espectrômetro de Massas Waters[®]. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Acquity UPLC[®]BEH3000 C18 1,7 μ m, 2,1 x 100 mm com 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) (A) e 0,01% de ácido fórmico em metanol (v/v) (B) como uma fase móvel binária. Todas as amostras foram analisadas usando um programa de eluição gradiente, começando em 5% B, aumentando para 100% B ao longo de 12 minutos, mantendo-o por 2 minutos e, em seguida, retornando as condições iniciais 17 minutos. A taxa de fluxo foi ajustada em 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 5 μ L. O espectrômetro de massa foi equipado com uma fonte ESI e operado em modo de íons negativos. A energia de colisão foi 40 V e a voltagem do cone foi 40 V. As massas pesquisadas foram: m/z 609, 593, 580, 463, 301, 285, 179, as quais são descritas na literatura como presentes nas espécies do gênero *Kalanchoe*.

4.9 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

4.9.1 Cuidados éticos

Os peixes foram mantidos de acordo com o Instituto Nacional de Saúde Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (protocolo número 23.000015025-2).

4.9.2 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados Zebrafish (*Danio reiro*) adultos (4-6 meses) de linhagem selvagem obtidos de estoques de um aquarista local

da cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Os peixes foram mantidos em tanques de vidro (100 L) contendo água desclorada mantida sob constante aeração, filtração mecânica e química (25-27 °C; pH 7-8; amônia total < 0,01 mg/L; nitrito < 0,01 mg/L, controladas por meio de kits comerciais (pH, nitrito e amônia) e o ciclo claro-escuro de 14:10 h, fornecido por tubos de lâmpadas fluorescentes (12 Watts; luzes acesas às 7:00 da manhã). Os animais foram aclimatados no laboratório por 15 dias antes dos testes. Além disso, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos por meio de alimentador automático.

4.9.3 Grupos experimentais

Para avaliar o efeito ansiolítico dos extratos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* os animais foram divididos aleatoriamente para recebimento dos tratamentos, em grupos experimentais (**Tabela 03**).

Tabela 03 - Grupos experimentais

Grupos	Tratamento
Grupo 1	Somente água do aquário de manutenção
Grupo 2	Clonazepan (0,75mg/L)
Grupo KC1	Extrato aquoso de <i>K. crenata</i> (1g/L)
Grupo KM1	Extrato aquoso de <i>K. marmorata</i> (1g/L)
Grupo KP1	Extrato aquoso de <i>K. pinnata</i> (1g/L)
Grupo KC1	Extrato aquoso de <i>K. crenata</i> (0,1g/L)
Grupo KM1	Extrato aquoso de <i>K. marmorata</i> (0,1g/L)
Grupo KP1	Extrato aquoso de <i>K. pinnata</i> (0,1g/L)

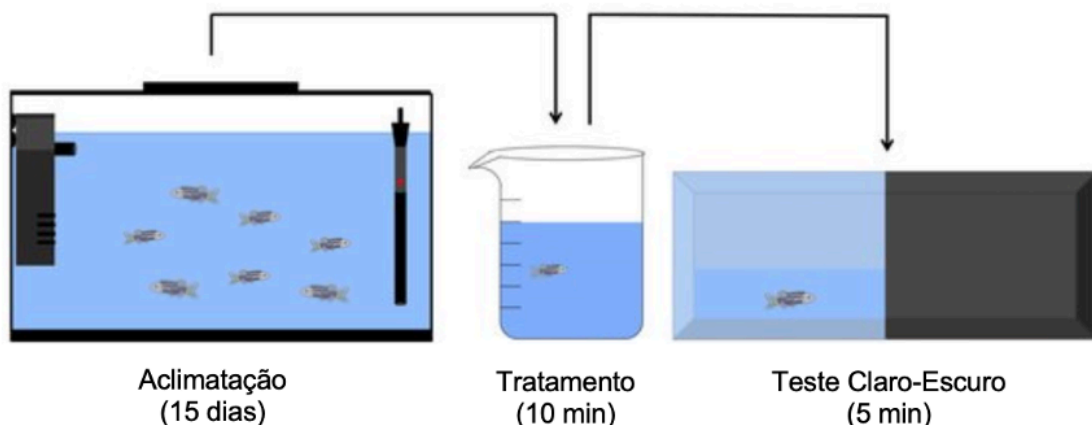
Todas as soluções foram preparadas com a água contida no aquário de manutenção dos peixes. As concentrações dos extratos empregadas na execução deste trabalho foram escolhidas com base em experimentos piloto, que reduziram os níveis de ansiedade e não apresentaram efeitos letal ou sedativo no peixe-zebra durante o experimento.

4.9.4 Teste claro-escuro

A atividade ansiolítica dos extratos foi avaliada pelo teste claro-escuro segundo o método descrito por Gebauer *et al.* (2011). Os testes foram realizados no tanque claro-escuro (um tanque retangular dividido em duas porções verticais iguais

por coloração preta e branca medindo $18 \times 9 \times 7 \text{ cm}^3$) e preenchido com 3 cm de nível de água. Cada animal foi imerso individualmente na solução contendo as amostras por 10 min. Após o tratamento, cada animal foi colocado individualmente no compartimento de luz do tanque e deixado por um período de habituação de 5 min. Em seguida, a porta deslizante foi aberta para uma abertura de cerca de 1 cm de altura, permitindo que os peixes explorassem todo o tanque por 5 min (**Figura 12**). O tempo gasto por cada animal no compartimento de luz foi medido, bem como avaliado o tempo de latência para a primeira entrada no lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. Esses parâmetros foram selecionados para avaliar o efeito ansiolítico ao invés do efeito sedativo para as amostras estudadas.

FIGURA 12 - Representação esquemática do protocolo experimental do Teste claro-escuro.



Fonte: Adaptado de PANCOTTO, L. et al. Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish. PeerJ. 2018.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo software *OriginPro®2022b Student Version*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para as quantificações e ensaios antioxidantes. Para os testes *in vivo* foi feita análise de normalidade de Shapiro-Wilk seguido de análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ENSAIOS FARMACOBOTÂNICOS

5.1.1 Análise morfológica

Os aspectos botânicos de apenas 16 das 133 espécies do gênero *Kalanchoe* foram descritos na literatura. Mais especificamente, 12 destas possuem alguma descrição macroscópica, sendo duas delas *K. pinnata* e *K. marmorata* (Akulova-Barlow, 2009; García-Sogo *et al.*, 2009; Herrando-Moraira *et al.*, 2020; Lai *et al.* 2010; Smith *et al.*, 2019), não havendo descrição botânica para a espécie *K. crenata*.

As espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* apresentam folhas suculentas, glabras, lisas, uninérveas, com caule não-ramificado, e com filotaxia do tipo oposta-cruzada (**Figura 13, a1, b2, c1**). As folhas destas espécies medem de 5 a 10 cm de comprimento e de 3 a 6 cm de largura; sendo de *K. crenata* e *K. marmorata* não pecioladas (**Figura 13, a4, b4**) e *K. pinnata* peciolada (**Figura 13, c4**). Elas apresentam coloração verde brilhante em ambas as faces, tendo a espécie *K. marmorata* manchas arroxeadas em ambas as faces da folha, com predominância na face abaxial (**Figura 13, b4**). Estas características de coloração foliar já foram descritas por Akulova-Barlow (2009), Majaz *et al.* (2011), Bhatti *et al.* (2012) e Shruti *et al.* (2018).

Em relação ao formato das folhas é possível identificar folhas com forma variando de obovada à ovalada, base atenuada e margem crenada, para as três espécies, com a diferenciação do ápice, sendo arredondado para *K. marmorata* e *K. pinnata* (**Figura 13, b4, c4**) e agudo para *K. crenata* (**Figura 13, a4**).

A floração de *K. marmorata* e *K. crenata* se desenvolve na forma de inflorescências terminais ao pedúnculo principal, com flores tetrâmeras, de coloração branca, medindo de 6 a 10 cm de comprimento para *K. marmorata*, (**Figura 13, b2, b3**) assim como descritas por Akulova-Barlow (2009); e com coloração amarela, medindo de 3 a 5 cm, para *K. crenata* (**Figura 13, a2, a3**). A floração de *K. pinnata* também é observada como o alongamento vertical do pedúnculo, desenvolvendo inflorescências terminais corimbiformes com flores pendentes, tetrâmeras, em aspecto de sinos, de coloração rósea, medindo de 2 a 3 cm de comprimento (**Figura 13, c2, c3**); características congruentes com as apresentadas por Majaz *et al.* (2011), Bhatti *et al.* (2012) e Shruti *et al.* (2018).

Figura 13 - Aspectos morfológicos das espécies *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: a autora.

Legenda: a. *K. crenata*, b. *K. marmorata*, c. *K. pinnata*. 1. Planta antes da floração. 2. Planta florida. 3. Flor. 4. Folha.

5.1.2 Análise microscópica

Os caracteres morfológicos por si só não são suficientes para se determinar a autenticidade de uma espécie vegetal. Deste modo, as características microscópicas são muito valiosas para a análise de materiais vegetais, uma vez que as características anatômicas, em especial os marcadores botânicos, são fatores determinantes quando se trata da identificação da espécie vegetal (Manfron, 2021).

Quanto à avaliação anatômica, para as folhas de *K. marmorata* em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas são retas em ambas as faces (**Figura 14, b**). Para *K. crenata*, as paredes aparecem retas a levemente sinuosas na face adaxial e sinuosas na face abaxial (**Figura 14, a**), assim como relatado por Moreira *et al.* (2012). Na literatura, para a espécie *K. pinnata*, as paredes anticlinais são sinuosas em ambos os lados (Chernetsky; Weryszko-Chmielewska, 2008), o que se confirma nos achados do presente estudo (**Figura 14, c**).

Os estômatos observados nas espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* são do tipo anisocítico (**Figura 14, d, e, f**) e estão presentes em ambas as faces, caracterizando-as como anfiestomáticas. Folhas anfiestomáticas e estômatos anisocíticos são comuns em espécies da família Crassulaceae, do gênero *Kalanchoe* e já descritas para a espécie *K. pinnata* (Chernetsky; Weryszko-Chmielewska, 2008; Chernetsky *et al.*, 2018; Shruti *et al.*, 2018).

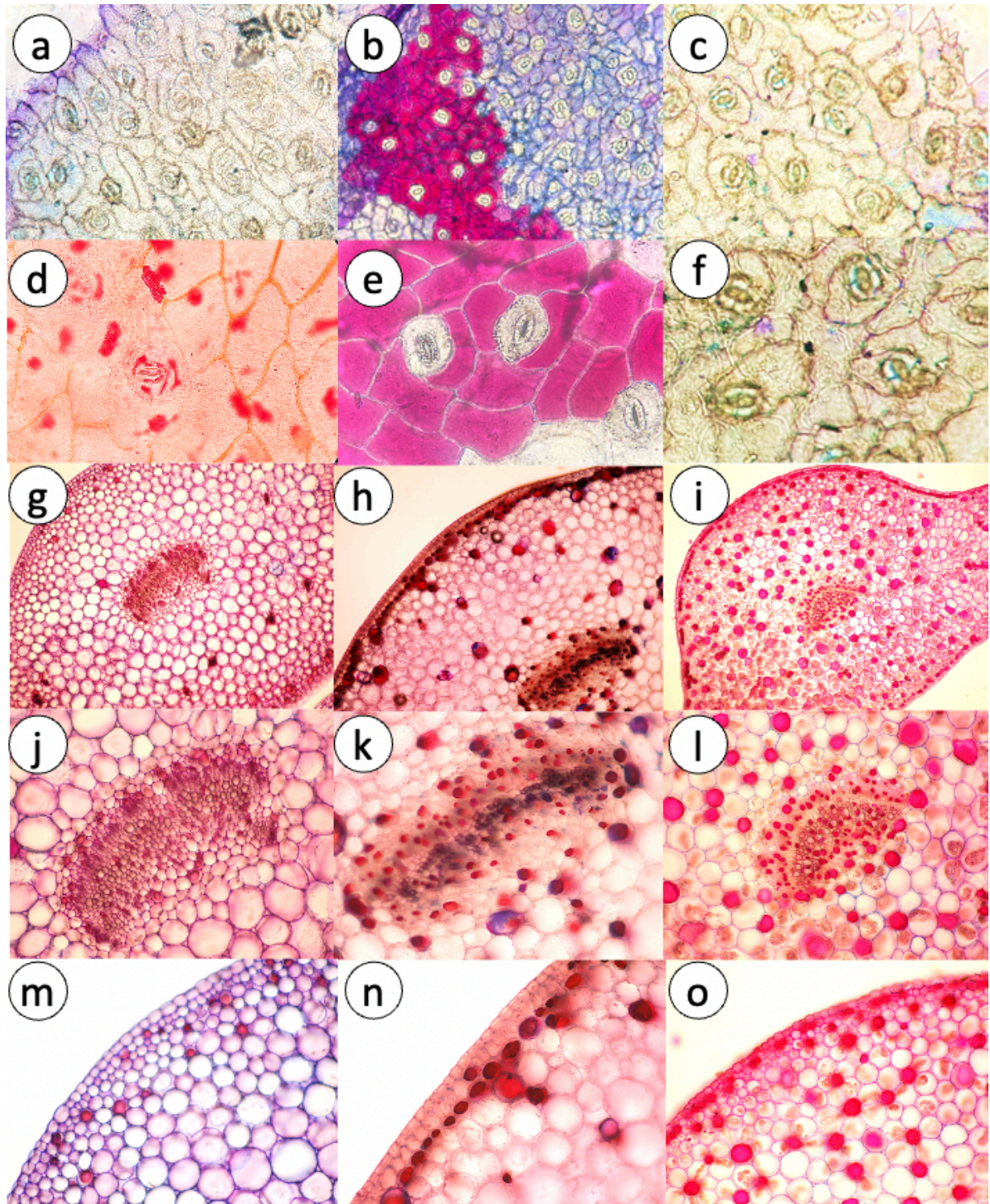
Em corte transversal, as folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* apresentam epiderme unisseriada e as cutículas das três espécies são lisas e finas. (**Figura 14, m, n, o**). A cutícula fina também foi descrita para o caule de *K. daigremontiana* por Abdel-Raouf (2012). O mesofilo das espécies é homogêneo e composto por várias camadas de parênquima esponjoso e pequenos feixes vasculares colaterais distribuídos na região central do mesofilo, tendo a presença de idioblastos fenólicos distribuídos no mesofilo (**Figura 14, g, h, i**).

A nervura central, em corte transversal, é do tipo plano-plano para a espécie *K. marmorata* (**Figura 14, k**) e plano-convexo para *K. crenata* e *K. pinnata* (**Figura 14, j, l**), todas com feixe vascular único, do tipo arco colateral aberto. No parênquima fundamental há a presença de idioblastos fenólicos.

Raramente são encontrados tricomas em espécies da família Crassulaceae (Metcalfe; Chalk, 1950). Em apenas três espécies (*K. beharensis*, *K. tomentosa* e *K.*

caniflora) são relatados tricomas (Abdel-Raouf, 2012). Neste estudo, não foram encontrados tricomas.

Figura 14 - Aspectos anatômicos das folhas das espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.

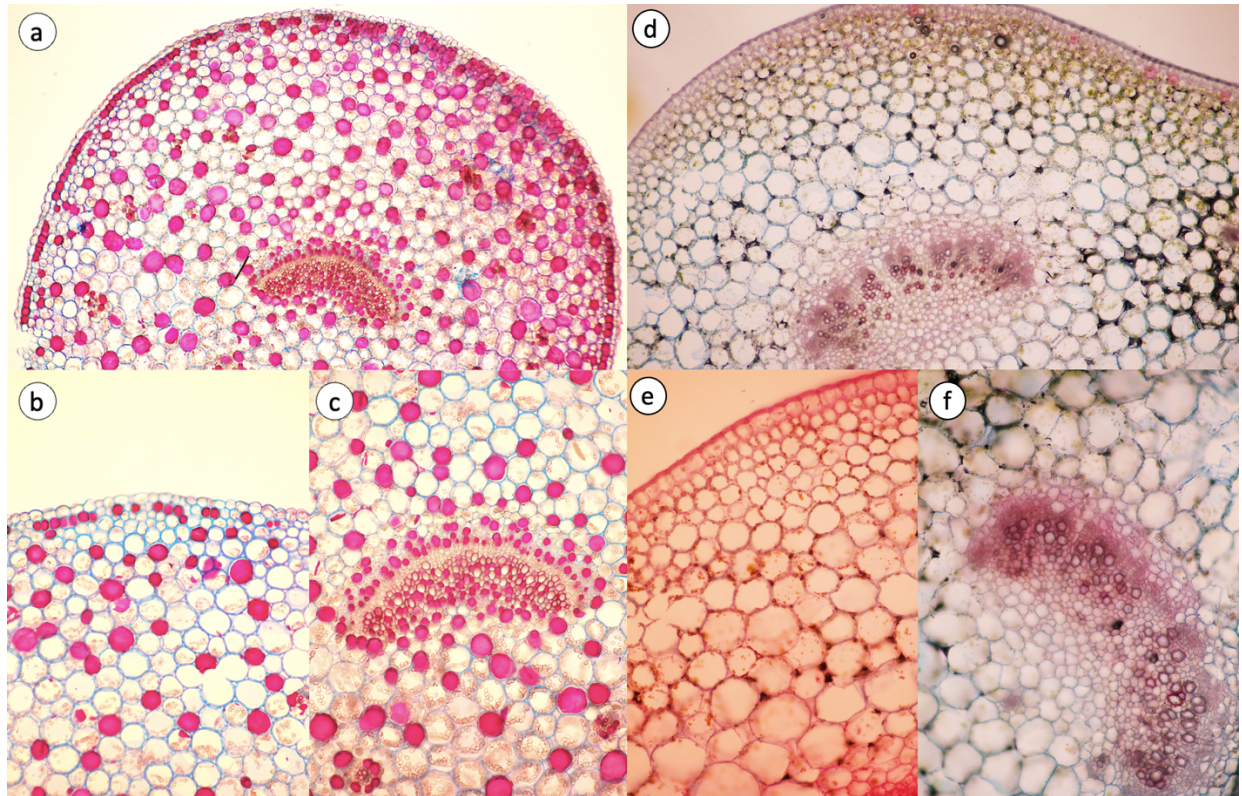


Fonte: a autora.

Legenda: a, d, g, j, m: aspectos anatômicos de *K. crenata*; b, e, h, k, n: aspectos anatômicos de *K. marmorata*; c, f, i, l, o: aspectos anatômicos de *K. pinnata*.

Apenas *K. pinnata* e *K. crenata* apresentam pecíolo o qual apresenta formato circular para as duas espécies (**Figura 15**), mantendo as características de feixe vascular e epiderme da folha das respectivas espécies.

Figura 15 - Aspectos anatômicos do pecíolo de *K. pinnata* e *K. crenata*.

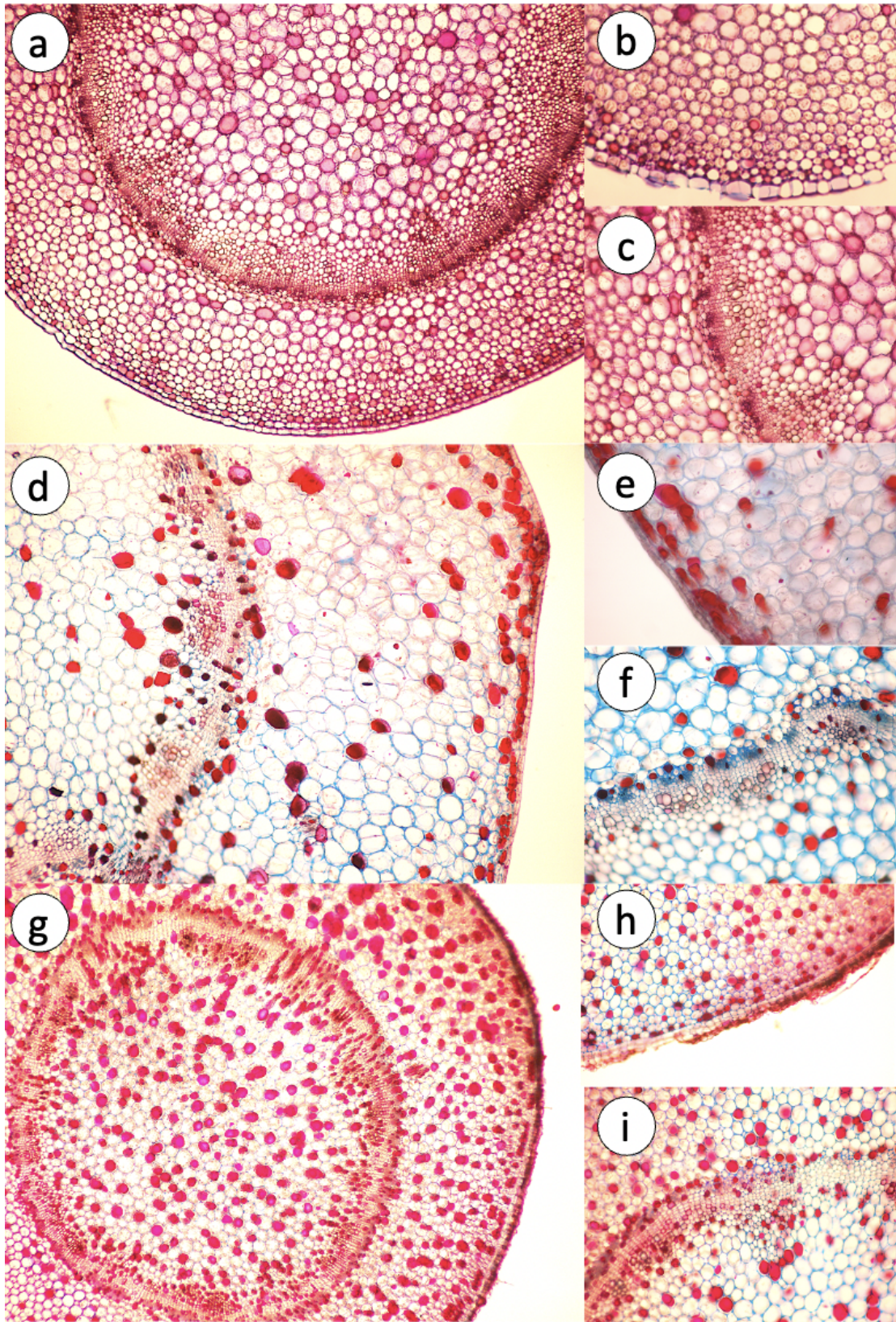


Fonte: a autora.

Legenda: a-c: *K. pinnata*; d-f: *K. crenata*; a, d: pecíolo; b, e: epiderme do pecíolo; c, f: feixe vascular do pecíolo.

Os caules das espécies, em secção transversal, têm formato circular (**Figura 16, a, d, g**). As características da cutícula e da epiderme são as mesmas relatadas anteriormente (**Figura 16, b, e, h**). Na região do córtex caulinar, encontram-se algumas camadas de colênquima. O feixe vascular forma um cilindro contínuo. Na região da medula, as células são isodiamétricas (**Figura 16, c, h, i**).

Figura 16 - Aspectos anatômicos dos caules das espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.



Fonte: autora.

Legenda: a, b, c: aspectos anatômicos de *K. crenata*; d, e, f: aspectos anatômicos de *K. marmorata*; g, h, i: aspectos anatômicos de *K. pinnata*.

5.2 TESTES HISTOQUÍMICOS

O conteúdo celular pode ser considerado uma característica diagnóstica importante e complementar à análise micromorfológica. Para tanto, são realizados testes histoquímicos com soluções capazes de reagir com determinadas substâncias da espécie vegetal e, deste modo, evidenciar estruturas e componentes específicos (Manfron, 2021).

Em testes histoquímicos, o Sudam III é um reativo que cora os compostos lipídicos de vermelho-alaranjado; compostos fenólicos são evidenciados por solução de cloreto férrico, no qual produz coloração marrom escura ou preta, ou por solução de dicromato de potássio, no qual produz cor marrom ou marrom-avermelhada; e o azul de metileno é um reativo que cora células contendo mucilagem de azul. (Almeida *et al.*, 2023).

As cutículas foliares de ambas as espécies reagiram positivamente aos compostos lipofílicos (**Figura 17, d, e, f**); sendo essa característica encontrada na maioria das espécies do gênero *Kalanchoe* (Abdel-Raouf, 2012).

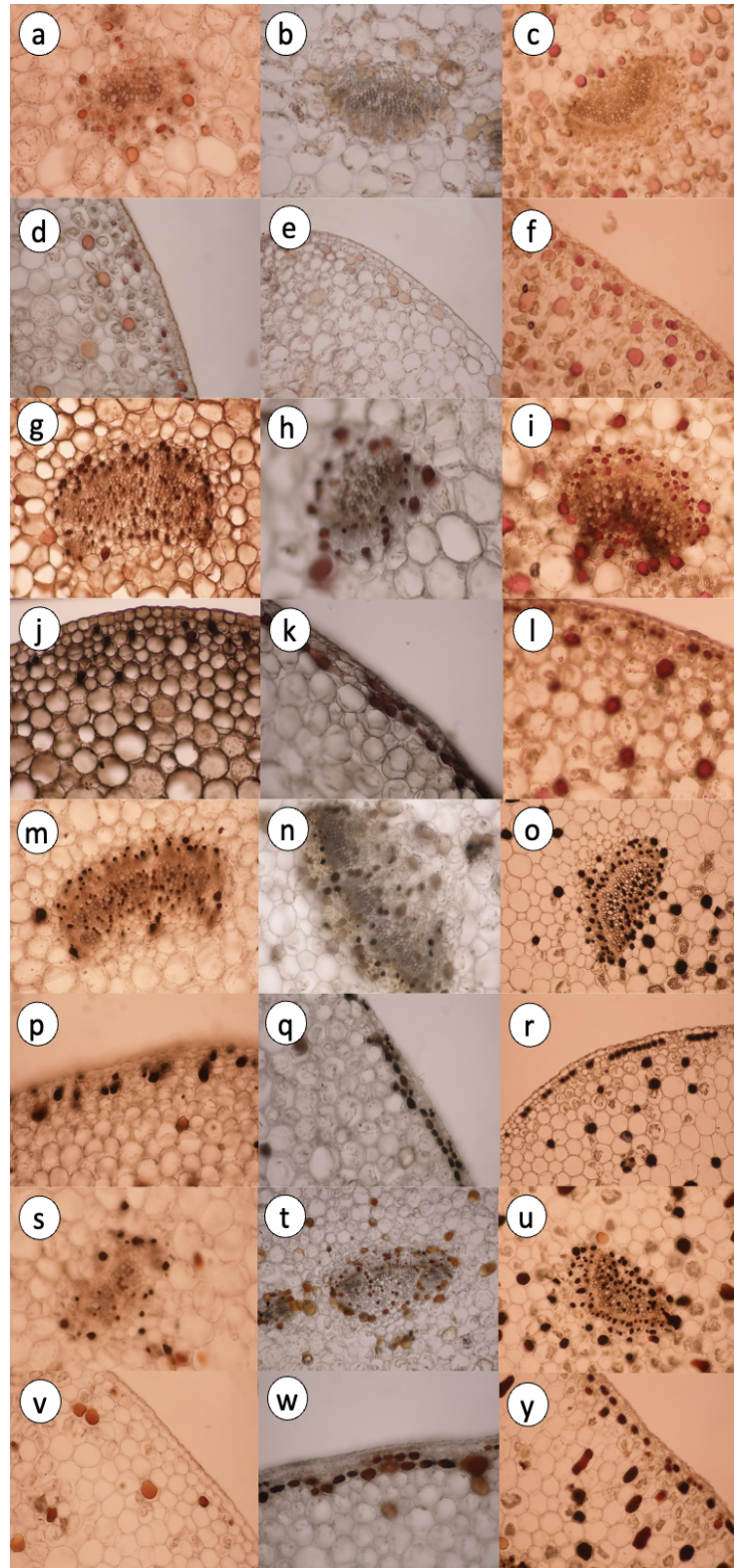
As camadas subepidérmicas das folhas de ambas as espécies reagiram com Sudam III (**Figura 17, d, e, f**), Sudam Black (**Figura 17, j, k, l**), cloreto férrico (**Figura 17, p, q, r**) dicromato de potássio (**Figura 17, v, w, y**), indicando a presença de compostos lipofílicos e fenólicos. Para a espécie *K. crenata*, essas reações ocorrem na primeira camada abaixo da epiderme, enquanto para a espécie *K. marmorata* e *K. pinnata* essas reações ocorrem em algumas células da epiderme e na primeira camada abaixo da epiderme.

Elementos de vasos lignificados são evidenciados pela floroglucina clorídrica nos elementos de vasos do xilema das folhas das três espécies estudadas. Também no sistema vascular, reações positivas a compostos fenólicos foram observadas nas células do floema e do parênquima do xilema das folhas (**Figura 17, m, n, o, s, t, u**).

Os idioblastos reagem na presença de compostos lipofílicos e fenólicos, sendo observados na região do colênquima, preenchendo o parênquima, próximo aos feixes vasculares, no floema e nas células parenquimatosas do xilema. Sendo que, os resultados positivos, principalmente quanto à presença de compostos fenólicos, concordam com a literatura, uma vez que estes são amplamente relatados na composição química de espécies do gênero (Nascimento *et al.*, 2013; Bogucka-Kocka

et al., 2018; Elansary *et al.*, 2018; Richwagen *et al.*, 2019; Palumbo *et al.*, 2019; Hegazy *et al.*, 2021).

Figura 17 - Aspectos histoquímicos das folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.

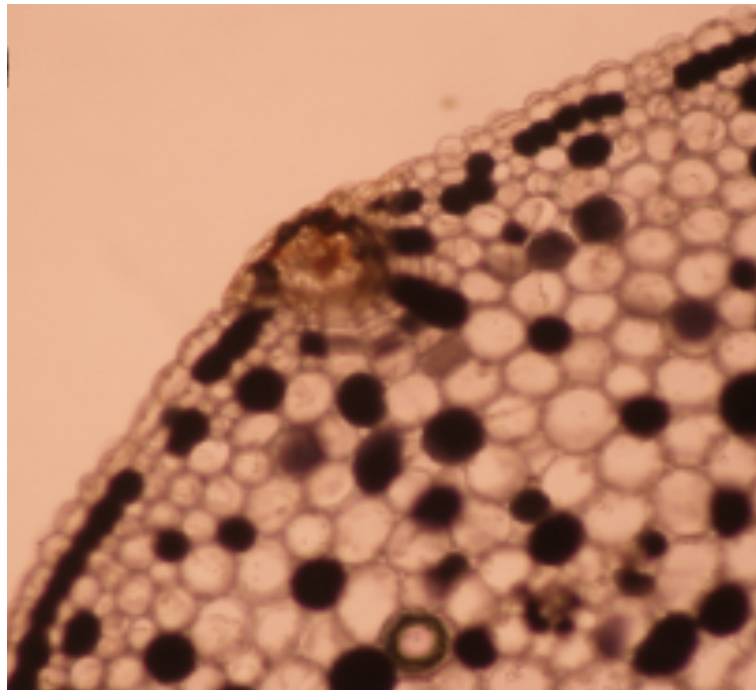


Fonte: a autora.

Legenda: a, d, g, j, m, p, s, v: aspectos histoquímicos de *K. crenata*; b, e, h, k, n, q, t, w: aspectos histoquímicos de *K. marmorata*, c, f, i, l, o, r, u, y: aspectos histoquímicos de *K. pinnata* a-f: sudam III; g-l: sudam black; m-r: cloreto férrico; s-y: dicromato de potássio.

Em relação ao pecíolo, a cutícula de *K. pinnata* e *K. crenata* é lisa e delgada. Idioblastos reagem a pesquisa de compostos fenólicos, sendo vistos na região do colênquima, parênquima de preenchimento, próximos aos feixes vasculares, no floema e nas células parenquimáticas do xilema. Além disso, foram identificados cristais prismáticos nas células do parênquima de *K. pinnata* (**Figura 18**), os quais foram descritos por Shruti *et al.* (2018) como sendo cristais de oxalato de cálcio.

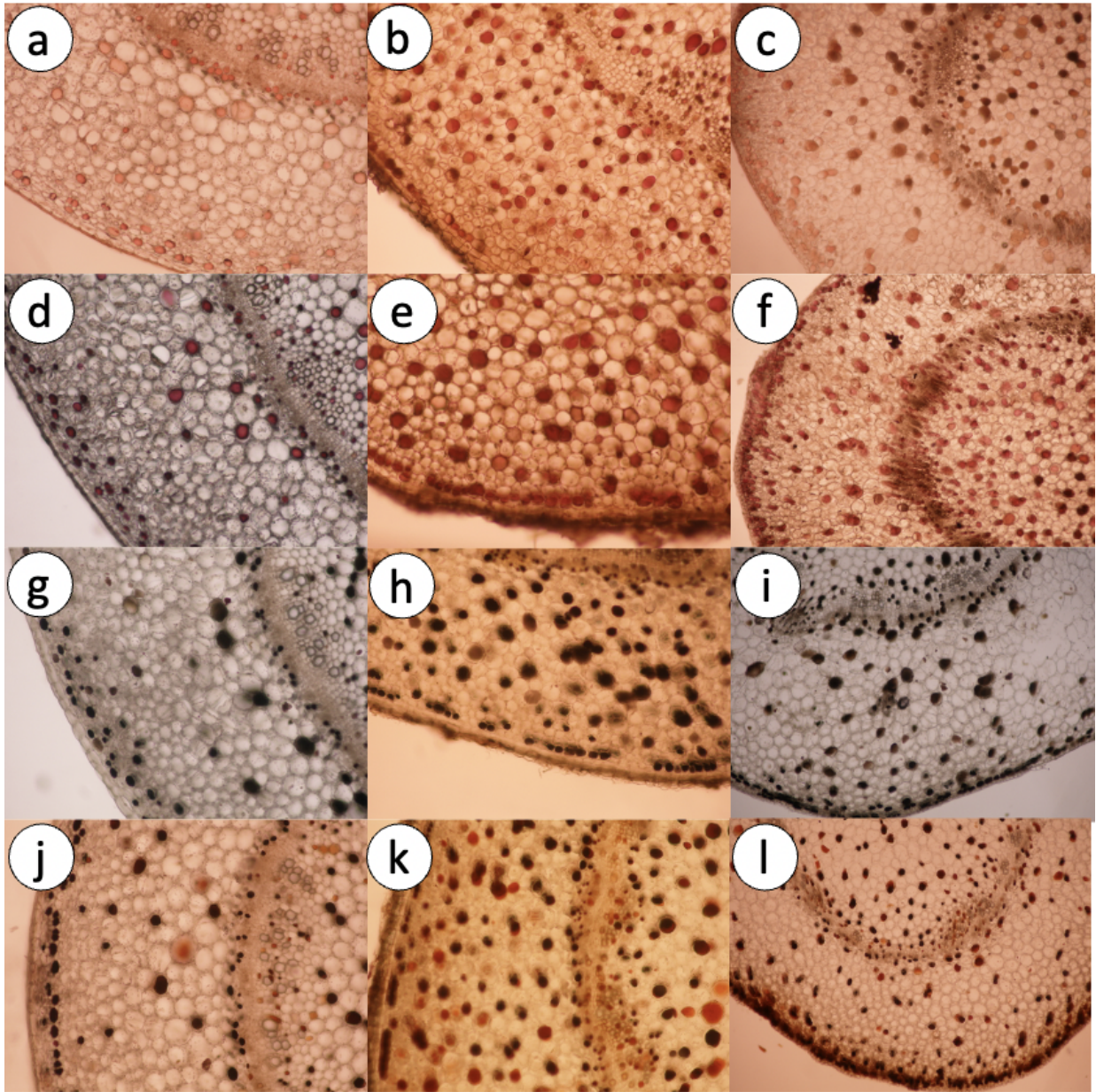
Figura 18 – Cristal presente no pecíolo de *K. pinnata*.



Fonte: A autora.

Os caules das espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* apresentam cutícula lisa e delgada, as mesmas características descritas para a folha. Na hipoderme, córtex e medula do caule são observados idioblastos que reagem na presença de compostos fenólicos (**Figura 19, g, h, i, j, k, l**). Grãos de amido não foram evidenciados nas das partes vegetativas aéreas analisadas neste estudo.

Figura 19 – Aspectos histoquímicos dos caules de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.



Fonte: a autora.

Legenda: a, d, g, j: aspectos histoquímicos de *K. crenata*; b, e, h, k: aspectos histoquímicos de *K. marmorata*; c, f, i, l: aspectos histoquímicos de *K. pinnata* a-c: sudam III; d-f: sudam black; g-i: cloreto férrico; j-l: dicromato de potássio.

5.3 ANÁLISE CLUE-DAD

As espécies pertencentes ao gênero *Kalanchoe* são ricas em compostos fenólicos, entre eles os flavonoides provenientes dos núcleos quercetina, campeferol, eupafolina e patuletina (Nascimento; Casanova; Costa, 2023). A partir dos resultados de reação histoquímica positiva para a presença de compostos fenólicos nas três as espécies, identificou-se a presença dos flavonoides através de CLUE-DAD.

A investigação do perfil químico avaliando a presença de compostos fenólicos, sobretudo flavonoides, é apresentada nas **Figuras 20, 21 e 22**.

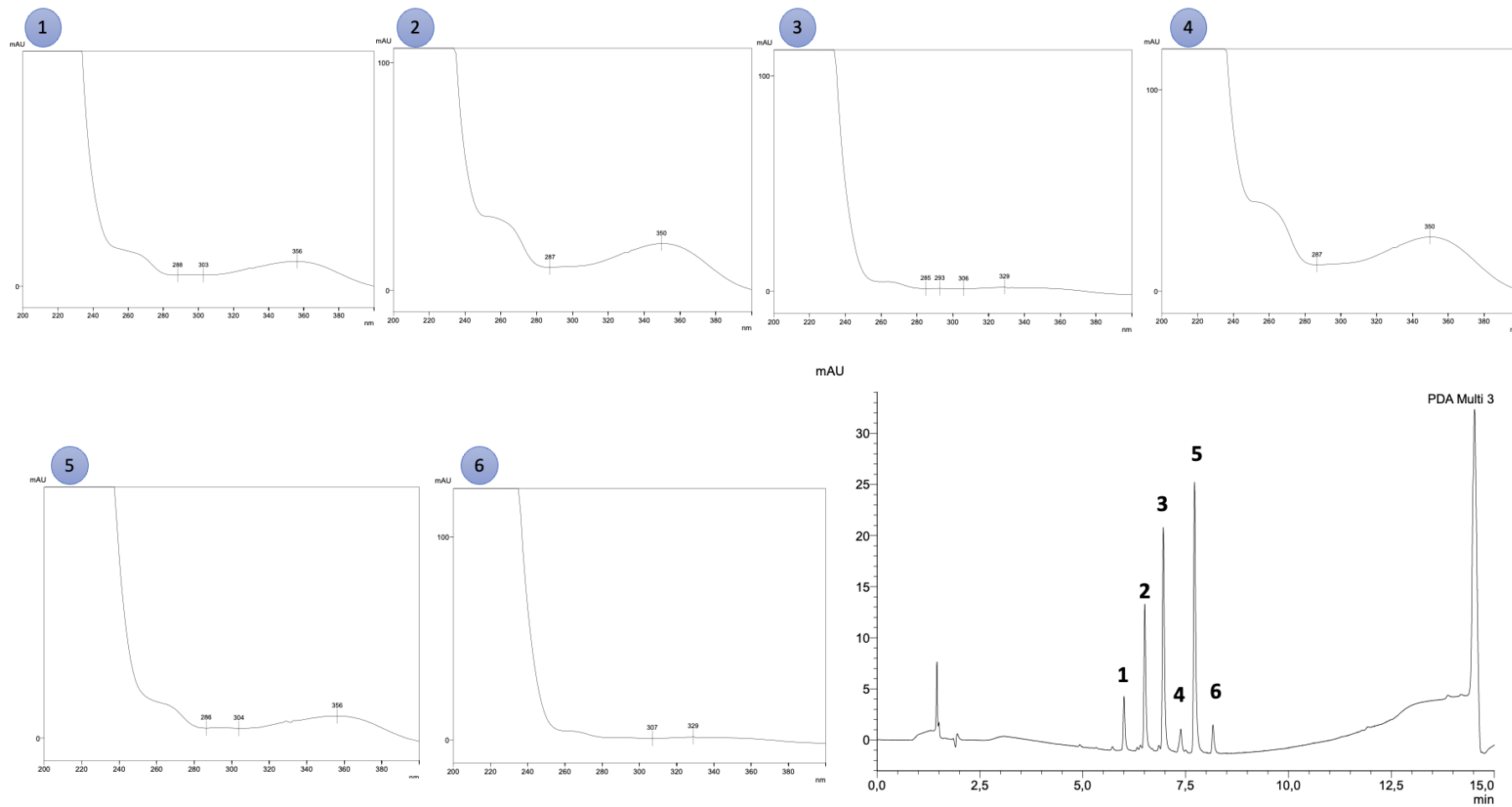
Para os flavonoides, o espectro UV apresenta duas bandas de absorção máxima. A primeira delas, encontra-se entre 240 e 285 nm, correspondendo à absorção do grupo benzoíla, relacionada ao anel A, da estrutura básica dos flavonoides; e a segunda possui absorção a 300 e 400 nm, correspondente ao grupo cinamoil e relacionada aos anéis B e C (Fernandes *et al.*, 2019).

O tipo de flavonoide e o padrão de oxigenação da sua estrutura ocasionam alterações na posição e intensidade relativa de cada um dos máximos de absorção. Substituintes, tais como metila, metoxila e grupo hidroxila não-dissociados, geralmente demonstram apenas pequenas alterações na posição da absorção máxima. Sabe-se que, na maioria das vezes, um aumento da oxigenação na estrutura química provoca um desvio das bandas para maiores comprimentos de onda (Fernandes *et al.*, 2019).

Para as espécies *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* foi possível identificar bandas de absorção entre 246 nm e 353 nm, afirmando a presença de flavonoides.

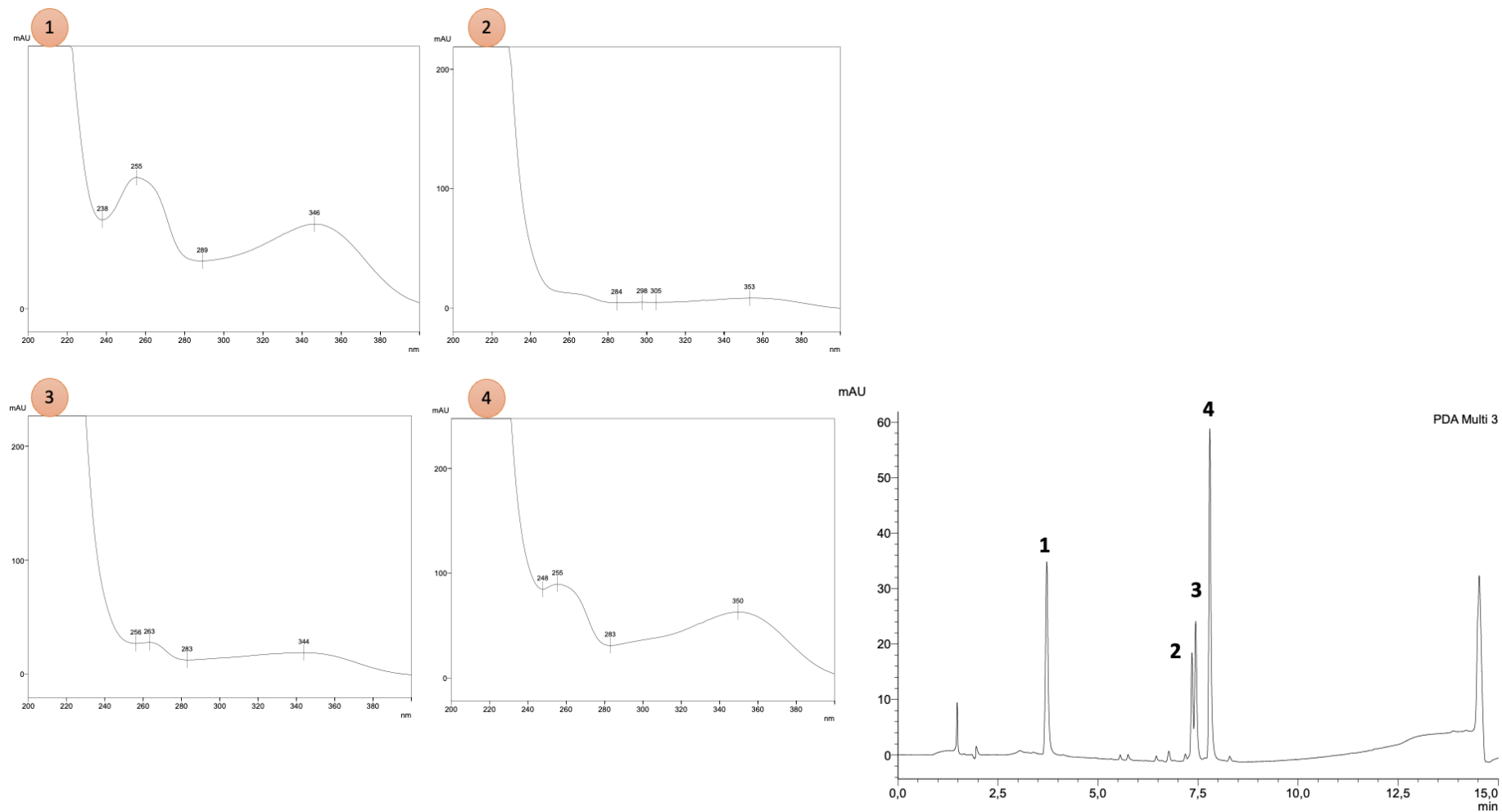
Fernandes *et al.* (2019) descreveram para o extrato etanólico de *K. pinnata* as absorbâncias máximas de UV entre 251 e 365 nm como sendo relativas a flavonoides derivados de quercetina e campeferol. Também relataram-se cinco picos e um pico principal, o qual foi sugestionado que correspondia à quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- α -L ramnopiranosideo, relatado na literatura como o principal flavonoide glicosilado de *K. pinnata*. No presente trabalho também foi observado um pico principal.

Figura 20 – Cromatogramas e espectros de UV-Vis de *Kalanchoe crenata* obtidos por CLUE-DAD.



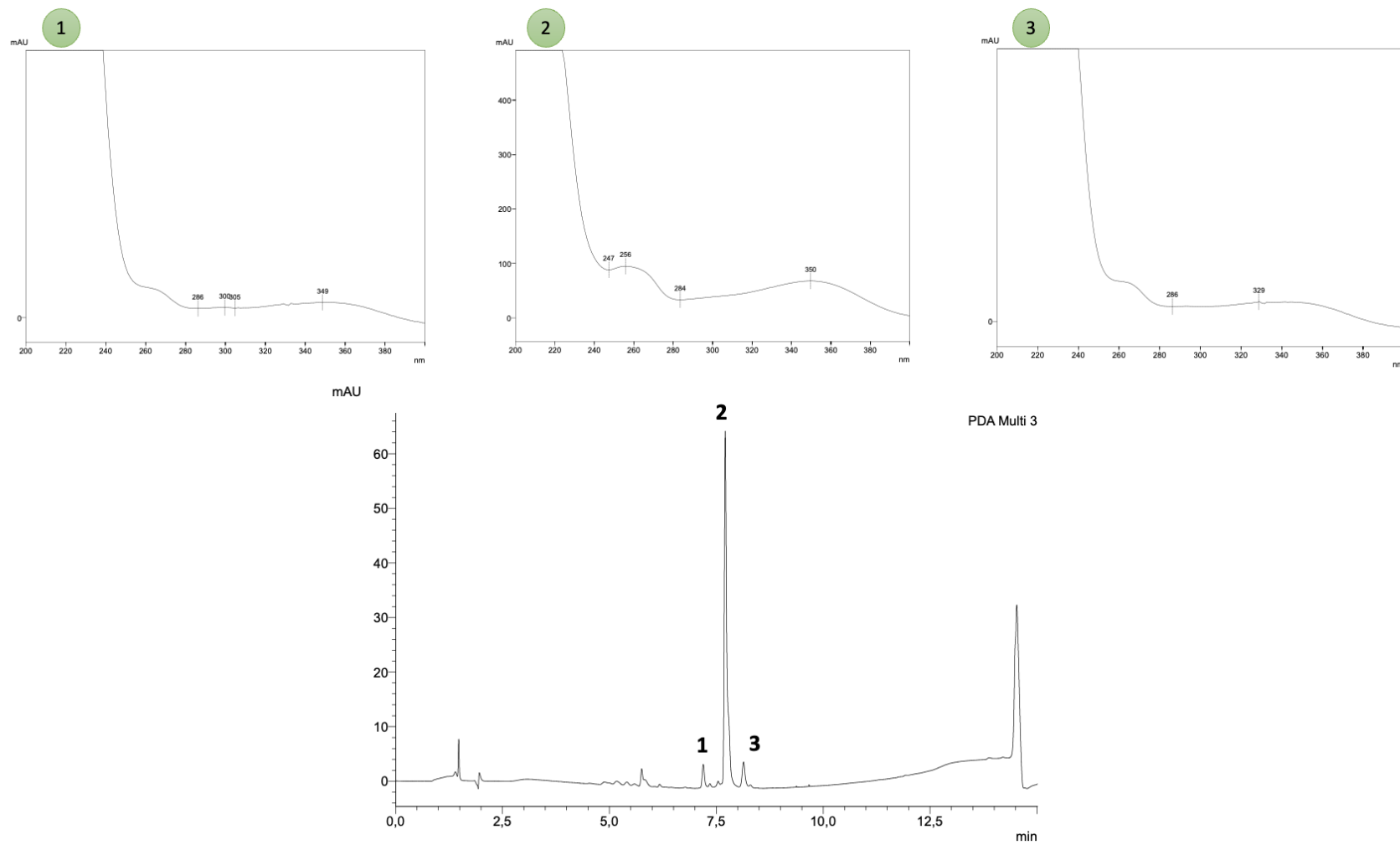
Fonte: a autora

Figura 21 - Cromatogramas e espectros de UV-Vis de *Kalanchoe marmorata* obtidos por CLUE-DAD.



Fonte: a autora

Figura 22 – Cromatogramas e espectros de UV-Vis de *Kalanchoe pinnata* obtidos por CLUE-DAD.



Fonte: a autora

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação de compostos fenólicos dá-se através do reagente de Folin-Ciocalteu, que é composto por molibdênio e o tungstênio, os quais se encontram no estado de oxidação e que na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, forma-se o complexo molibdênio-tungstênio, que tem coloração azul. A mudança de coloração permite quantificar o teor de compostos fenólicos em uma amostra por espectrofotometria. O composto fenólico sofre desprotonação em meio básico, gerando um ânion e ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion e o reagente de Folin-Ciocalteu, dessa forma, o molibdênio sofre redução e o meio reacional muda a coloração de amarelo para azul (Araújo, 2013).

A partir da identificação da presença de flavonoides nos extratos obtidos, quantificou-se os compostos fenólicos totais nos extratos aquosos através da equação da reta: $y = 0,2157x + 0,0665$ com $r^2 = 0,9882$ e os resultados das análises são demonstrados na **Tabela 04**.

Tabela 04 – Conteúdo de fenólicos totais em extratos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.

Espécie	mgEqAG/g
<i>Kalanchoe crenata</i>	24,64 ± 1,53 ^b
<i>Kalanchoe marmorata</i>	59,26 ± 1,53 ^a
<i>Kalanchoe pinnata</i>	22,48 ± 1,96 ^b

Fonte: a autora.

Legenda: mgEqAG/g extrato= miligramas Equivalentes a Ácido gálico por grama de extrato.

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes (a-b) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a $p < 0,05$).

Esta análise possibilitou verificar que os extratos de *K. marmorata* concentram quantidade maior de compostos fenólicos quando comparados aos extratos de *K. crenata* e *K. pinnata*.

São relatadas na literatura quantidades variáveis de compostos fenólicos em outras espécies do gênero *Kalanchoe* e em extratos obtidos por outros métodos extrativos e com outros solventes.

Para *K. pinnata*, tem-se relatado conteúdo fenólico total de $27,782 \pm 0,25$ µg/mg (equivalente de ácido gálico) (Bhandari *et al*, 2021); assim como ao demonstrado para o extrato hidroalcoólico de folhas, do qual obteve-se um teor de $28,4 \pm 2$ µg/mg (equivalente em quercetina) (Jaiswal; Chawla; Sawhney, 2014); estes dados são

similares ao valor obtido no presente trabalho para a mesma espécie.

Além disso, para outro extrato hidroalcoólico obteve-se teor de 0,952 mg/100mg (equivalente de ácido gálico) (Mishra *et al.*, 2019). Já para os extratos aquosos (obtidos por diferentes métodos), as concentrações variaram de 63,01-232,9 µg/mL (equivalente em ácido gálico) (Bhavsar *et al.*, 2018) e, para os extratos benzeno, clorofórmio, acetona e etanólico de folhas e caules, observou-se que as folhas (0,49-1,17% (v/v)) apresentaram teor de fenólicos totais significativamente maior do que caules (0,18-0,62% (v/v)) (Bhatti *et al.*, 2012).

Os valores obtidos neste trabalho estão inseridos na faixa apresentada na literatura, porém a correlação direta com os resultados já publicados torna-se limitada, devido às diferenças em relação à métodos extrativos, aos diferentes solventes utilizados e à escassez de dados já relatados para algumas das espécies aqui estudadas.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Tendo observado a presença de flavonoides, como já relatado na literatura, realizou-se a quantificação dessa classe de metabólitos secundários que demonstra grande importância para as espécies estudadas. Os dados da quantificação de flavonoides totais (**Tabela 05**) foram obtidos através da equação da reta: $y = 0,0041x + 0,0862$ com $r^2 = 0,9973$.

Tabela 05 – Conteúdo de flavonóides totais em extratos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.

Espécie	mgEqCQ/g
<i>Kalanchoe crenata</i>	2,26 ± 0,41 ^c
<i>Kalanchoe marmorata</i>	12,63 ± 0,91 ^a
<i>Kalanchoe pinnata</i>	10,43 ± 0,98 ^b

Fonte: A autora.

Legenda: mgEqCQ/g extrato= miligramas Equivalentes a Catequina por grama de extrato.

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes (a-c) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a $p < 0,05$).

Esta análise demonstrou que os extratos de *K. marmorata* concentram quantidade maior de flavonoides quando comparados aos extratos de *K. crenata* e *K. pinnata*.

Há poucos relatos de quantificação de flavonoides com o mesmo método realizado nesse trabalho, sendo descrito somente para a espécie *K. pinnata*: extrato hidroalcolico, o qual apresentou teor de 0,640 mg/100mg (equivalente de quercetina) (MISHRA *et al.*, 2019); extrato aquoso, aproximadamente 20 mg/g; e extrato metanólico, aproximadamente 110 mg/g (Asiedu-Gyekye *et al.*, 2012). O extrato metanólico apresentou maior quantidade e isto deve-se a característica do solvente extrator, pelo qual os flavonoides apresentam maior afinidade.

Assim, tem-se escassez de dados na literatura, limitando discussões, uma vez que diferentes solventes e métodos extrativos são empregados.

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Tem-se aumentado o foco dos estudos relacionados às espécies reativas de oxigênio, ao estresse oxidativo e suas consequências. Existem evidências de que os danos oxidativos em biomoléculas causam diversas disfunções, entre elas a neuroinflamação, a qual pode favorecer quadros neuropsiquiátricos, como a ansiedade. Isto posto, substâncias antioxidantes capazes de eliminar os radicais livres são conhecidas por desempenharem papéis importantes na prevenção de doenças induzidas por espécies reativas (Bogucka-Kocka *et al.*, 2018; Kim; Jeon, 2018).

O potencial antioxidante encontrado nas plantas é majoritariamente atribuído às propriedades dos compostos fenólicos, os quais podem exercer sua atividade antioxidante por meio de diversos mecanismos. Muitas plantas medicinais possuem atividades antioxidantes e têm sido utilizadas como fontes naturais. No entanto, embora a capacidade de prevenir o estresse oxidativo ou minimizar seus efeitos nocivos seja uma das atividades biológicas mais frequentemente associadas às substâncias derivadas de plantas, as ações antioxidantes dos extratos de diferentes espécies de *Kalanchoe* ainda não foram completamente elucidadas, tendo dados de ensaios *in vitro* apenas para a espécie *K. pinnata*, dentre as estudadas neste trabalho (Simões *et al.*, 2017; Bogucka-Kocka *et al.*, 2018; Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016; Nascimento; Casanova; Costa, 2023).

Compondo a classe de fenólicos, tem-se os flavonoides como importantes agentes antioxidantes e devido a diversidade estrutural das diversas subclasses de flavonoides, estes têm a capacidade de exercer ação antioxidante através de diferentes mecanismos. Isso inclui atrasar ou inibir a geração de espécies reativas,

capturar ou reduzir as espécies reativas já formadas, restaurar as defesas antioxidantes naturais do organismo, agir em conjunto com os antioxidantes endógenos ou se ligar a íons de metais de transição (Losada-Barreiro et al., 2022).

Atrelado a isso, diversos autores afirmam que nenhum método isolado é adequado para determinar completamente a capacidade antioxidante. Por conseguinte, é necessário realizar múltiplos ensaios para abranger todos os potenciais mecanismos de ação. Com o intuito de identificar variações na resposta dos compostos presentes nos extratos analisados, foram realizados ensaios de sequestro de radicais livres utilizando os métodos DPPH[•], ABTS^{•+} HOCl e ORAC, dos quais DPPH[•], ABTS^{•+} e ORAC os resultados estão apresentados na **Tabela 06**.

Tabela 06 – Atividade antioxidante de extratos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata*.

	ABTS^{•+}	DPPH[•]	ORAC
<i>Kalanchoe crenata</i>	134,93	501,49	4,393 ± 0,27 ^b
<i>Kalanchoe marmorata</i>	26,81	110,66	9,652 ± 0,75 ^a
<i>Kalanchoe pinnata</i>	62,94	208,26	4,712 ± 0,48 ^b
	p > 0,05	p > 0,05	

Fonte: A autora.

Legenda: Dados de ABTS e DPPH expressos em CI₅₀ ug/ml e dados de ORAC expressos em mmolTE/g (mmol de Trolox por grama de extrato).

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes (a-b) diferem estatisticamente na mesma coluna.

Os principais mecanismos pelos quais um flavonoide desempenha seu potencial antioxidante são: a transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), transferência única de elétron (SET) e a perda sequencial de próton e transferência de elétron (SPLET).

O DPPH[•] é um radical que, para se tornar uma molécula estável, aceita elétrons ou hidrogênio, atuando principalmente pelo mecanismo SET. A transferência de um átomo de hidrogênio pode acontecer, mas é considerado um mecanismo secundário (Prior *et al.*, 2005). Visto que os antioxidantes podem transferir elétrons e doar hidrogênio, estes possuem a capacidade de reduzir o radical DPPH[•], sendo a capacidade de redução do DPPH[•] por substâncias antioxidantes determinada por uma reação colorimétrica, através da mudança da coloração púrpura a amarelo pálido, com decréscimo de absorvância em espectrofotômetro (Alves *et al.*, 2010).

No ensaio de redução do radical catiônico ABTS^{•+}, gerado através da reação do sal ABTS com persulfato de potássio, de coloração azul escura, avalia-se,

principalmente, o mecanismo SET, assim como para o DPPH[•] (Prior *et al.*, 2005). Sendo a capacidade de redução do ABTS^{•+} medida pela diminuição da absorvância, visível através da mudança de cor de verde escuro para verde claro (Rufino *et al.*, 2007).

Em relação ao método ORAC, este consiste em um ensaio espectrofluorimétrico, baseado na capacidade de absorvância do radical de oxigênio, utilizando fluoresceína como marcador da capacidade antioxidante. No teste ORAC verifica-se a capacidade de inibição da oxidação dos radicais peroxila (ROO[•]), induzidos pelo iniciador AAPH (dihidroclorato de 2,2'-azobis [2-amidinopropano]), por meio da decomposição térmica desse azo-composto a 37 °C (Dudonne *et al.*, 2009). A captura do ROO[•] promove a interrupção de uma cadeia de reações que levarão à formação de outras espécies reativas e à peroxidação lipídica, ocorrendo exclusivamente via mecanismo HAT (Prior *et al.*, 2005).

As vantagens associadas ao uso do ensaio ORAC destacam-se não apenas a utilização de uma fonte biológica de radicais relevantes e a temperatura corporal humana, mas também o fato de ser o único método que integra o tempo e o grau de inibição por um antioxidante em um único valor. Dessa forma, o ensaio ORAC reproduz o mecanismo de ação e prevenção dos radicais livres no organismo (Dudonne *et al.*, 2009).

As diferenças apresentadas pelos métodos podem ser justificadas com base em várias razões, incluindo as distintas afinidades dos antioxidantes pelas substâncias oxidantes utilizadas nos ensaios, os mecanismos de ação envolvidos e a composição do meio reacional. Esses fatores podem influenciar nas respostas observadas e nas capacidades antioxidantes medidas pelos diferentes ensaios. É necessário considerar essas variações para obter uma avaliação completa das propriedades antioxidantes dos compostos em estudo (Kukoski *et al.*, 2005; Infante, 2013).

Dentre as espécies estudadas, *K. pinnata* apresenta maior número de estudos quanto ao potencial antioxidante. Por redução do radical DPPH[•], os extratos benzeno, etanol, acetato de etila e acetona demonstram valores de Cl₅₀ de 94-160 µg/mL nas folhas e 108-185 µg/mL no caule (Bhatti *et al.*, 2012). O extrato metanólico obtido por maceração apresentou 69,77 % de inibição do radical DPPH[•] (Bhandari *et al.*, 2021). O extrato etanólico do caule de *K. pinnata* foi avaliado por DPPH[•] e demonstrou alta atividade antioxidante (Cl₅₀: 37,28 µg/mL) (Kenderson *et al.*, 2021) e em comparação

com outros extratos de folhas (aquoso e éter de petróleo) apresentou o maior efeito inibitório ($49,5 \pm 5,6\%$ (2000 $\mu\text{g/mL}$)) (Quintero *et al.*, 2021).

Um único estudo apresentado na literatura realizou o ensaio ORAC em extrato hidroetanólico de *K. pinnata* (Sobreira *et al.*, 2017), obtendo o valor de 4,31 mmolTE/g, sendo este um valor próximo ao obtido no presente estudo para *K. pinnata* (4,712 mmolTE/g), bem como para *K. crenata* (4,393 mmolTE/g). Já a espécie *K. marmorata* apresentou resultado superior, sendo 9,652 mmolTE/g.

Comparado a outros estudos de atividade antioxidante de plantas medicinais, pode-se inferir que atividades antioxidantes consideráveis foram determinadas no presente trabalho, o qual obteve valores similares e/ou dentro da faixa esperada aos considerados satisfatórios para o gênero *Kalanchoe*, confirmando que estas espécies são fontes naturais de agentes antioxidantes, além de sugerir que o potencial antioxidante e a eficácia destas espécies podem ser atribuídos principalmente aos flavonoides (Adam *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2010, 2011; Mayorga *et al.*, 2019).

Isto posto, deve-se considerar que a atividade antioxidante de um flavonoide é afetada por uma série de fatores, incluindo o grau de substituição, a posição e as propriedades dos grupos funcionais, bem como particularidades conformacionais, além de que o tipo de solvente em que esses compostos estão presentes podem resultar em variações nos parâmetros que direcionam esses mecanismos (Kumar; Pandey, 2013). De forma que, faz-se necessária a compreensão das substâncias constituintes dos extratos para correlacionar as características estruturais de um flavonoide ao seu potencial antioxidante.

5.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA PERFORMANCE (CCD-AP) (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC)

A partir dos resultados obtidos com a quantificação de fenólicos e flavonoides, associado aos dados de potencial antioxidante, buscou-se a separação dos componentes dos extratos a fim de identificar qual seria o responsável pela ação avaliada. Para isso, realizou-se a CCD-AP.

Assim, a derivatização combinada das placas de CCD com os reagentes PN e Anisaldeído permitiu a visualização de todos os compostos polifenólicos presentes nos extratos aquosos das três espécies de *Kalanchoe* (**Figura 23**).

Pode-se notar a presença marcante de flavonoides devido a coloração amarelada das bandas cromatográficas presentes nas três espécies (**Figura 23; 4, 5, 6**), porém sendo bandas diferentes para cada extrato (**Figura 23; 7, 8**).

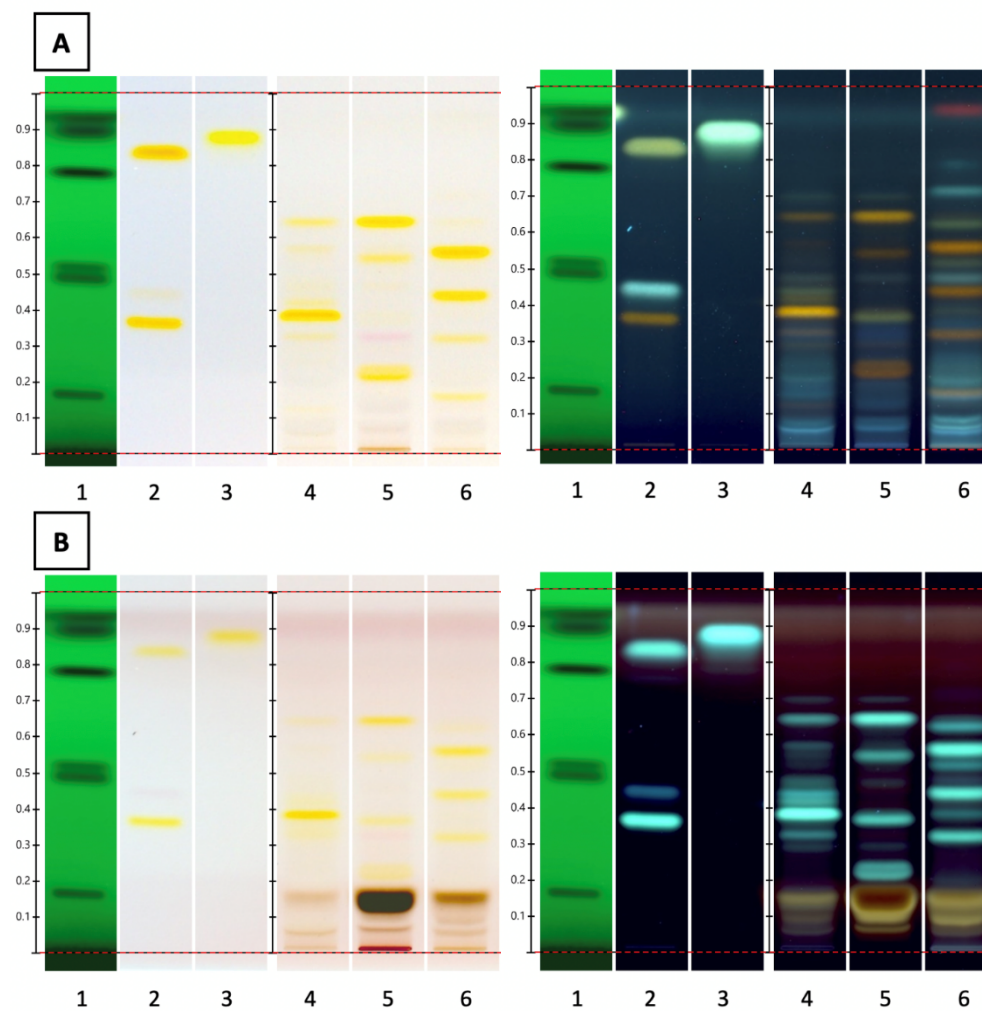
Não há estudos referentes a CCD-AP para espécies do gênero *Kalanchoe*, apenas relato de cromatografia em camada delgada convencional para a espécie *K. pinnata*, a qual também evidenciou as bandas amarelas, reafirmando a presença de flavonoides (Fernandes *et al.*, 2019).

Com isso, os ensaios com Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e ABTS^{•+} permitiram a determinação da correlação entre o resultado de quantificação de fenólicos (Folin-Ciocalteu) e o potencial antioxidante (DPPH[•] e ABTS^{•+}) das espécies (**Figura 24**).

Através dessa análise é possível identificar, para as três espécies, que as bandas cromatográficas mais evidentes no teste de Folin-Ciocalteu também são as que reagem positivamente de forma mais intensa nos testes de DPPH[•] e ABTS^{•+}.

Estes dados reforçam a relação já observada com os outros ensaios, nos quais a espécie *K. marmorata* demonstrou ter a maior presença de compostos fenólicos, em especial os flavonoides, e apresentou a maior capacidade de ação antioxidante frente aos modelos avaliados, evidenciando que os flavonoides presentes nessas espécies apresentam maior capacidade antioxidante em comparação à outras classes de metabólitos secundários presentes.

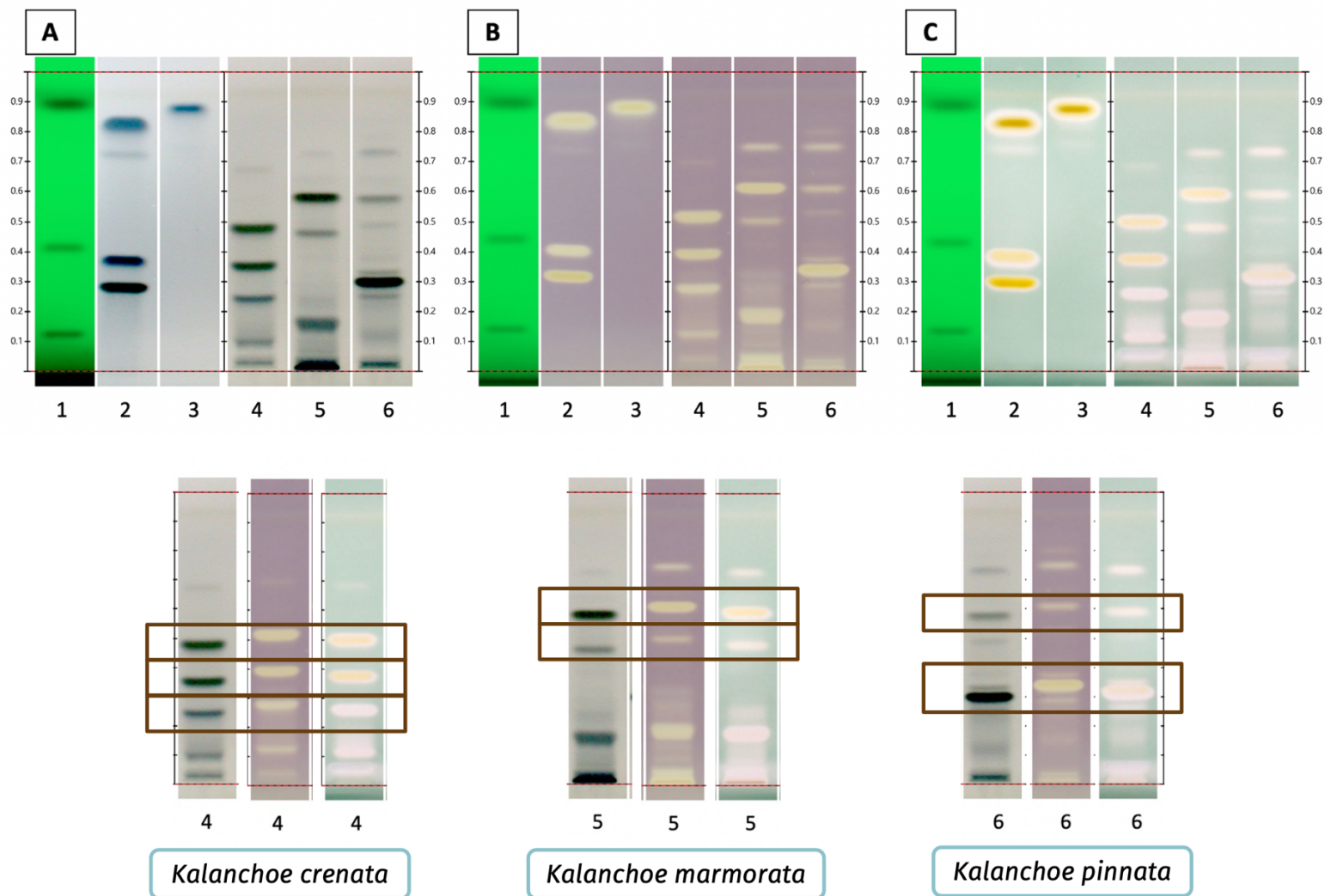
Figura 23 - CCD de Alta Performance em extratos de *Kalanchoe* antes(A) e após(B) derivatização combinada de PN-Anisaldeído.



Fonte: a autora.

Legenda: (1) SST (*system suitability test*), (2) Rutina, ácido clorogênico, quercetina, (3) kaempferol; (4) *K. pinnata*, (5) *K. marmorata*, (6) *K. crenata*,

Figura 24 - CCD-AP em extratos de *Kalanchoe* após derivatização com Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e ABTS^{•+}.



Fonte: a autora.

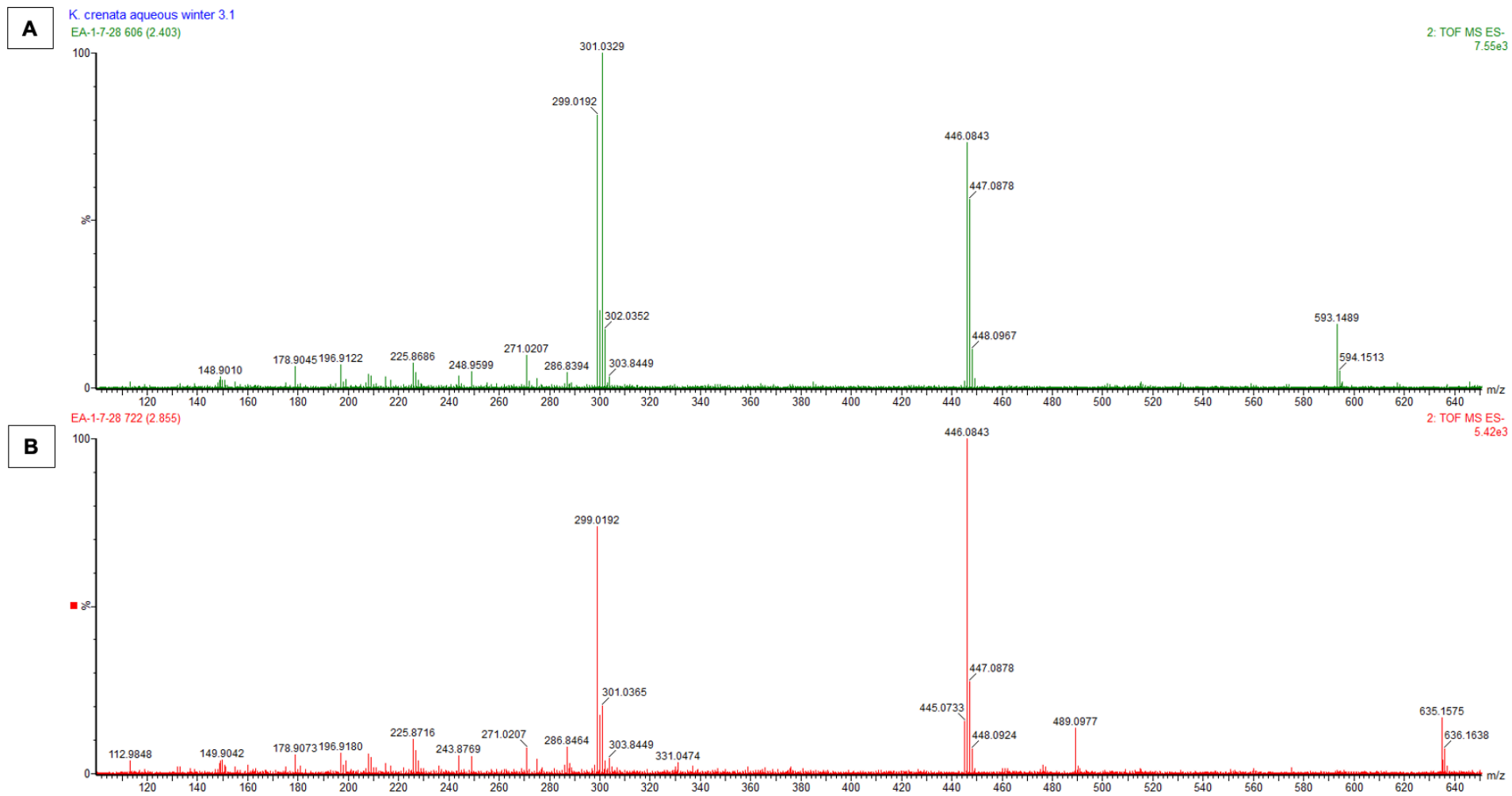
Legenda: (1) SST (*system suitability test*), (2) Rutina, ácido clorogênico, quercetina, (3) campeferol; (4) *K. crenata*, (5) *K. marmorata*, (6) *K. pinnata*. (A) Folin-Ciocalteu, (B) DPPH, (C) ABTS.

5.8.1 Análise EM-EM de compostos identificados por CCD

Os principais compostos bioativos observados previamente foram extraídos e analisados no espectrômetro de massas, os quais apresentam-se como sendo correspondentes a derivados de quercetina e campeferol.

Os espectros de massa dos extratos de *K. marmorata* e *K. crenata* demonstraram a presença de íons $[M-H]^-$ com m/z 609, tentativamente identificada como quercetina 3-rutinosídeo (Nielsen *et al.*, 2005), e as espécies *K. marmorata* e *K. pinnata* m/z 593, tentativamente identificada como quercetina 3-O-deoxihexosil(1-2) deoxihexosídeo (Nielsen *et al.*, 2005) (**Figura 25**). O espectro EM revela um fragmento de íon em m/z 301, sugerindo possuir um núcleo base de quercetina.

Adicionalmente, o espectro de massa do extrato de *K. crenata* apresentou outros compostos (**Figura 26**) que demonstraram $[M-H]^-$ íons com m/z 635 e m/z 593. O espectro EM revelou fragmento de íon em m/z 301 (quercetina) para ambos os compostos, tentativamente identificados como quercetinas glicosiladas (de Araújo *et al.*, 2019).

Figura 26 - Quercetina-glicosiladas em *Kalanchoe crenata*

Fonte: a autora.

Legenda: (A) m/z 593 (B) m/z 635.

5.8 CLUE-EM

As análises por espectrometria de massas dos extratos aquosos das folhas de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* são apresentadas nas **Figuras 27 a 31**.

A fim de relacionar os dados apresentados anteriormente, atentou-se aos compostos que já foram descritos para espécies do gênero e então, pesquisou-se fragmentos já identificados ou sugestivos de alguma substância, sugerindo a identificação de glicosídeos flavonoides derivados da quercetina, isoramnetina e campeferol.

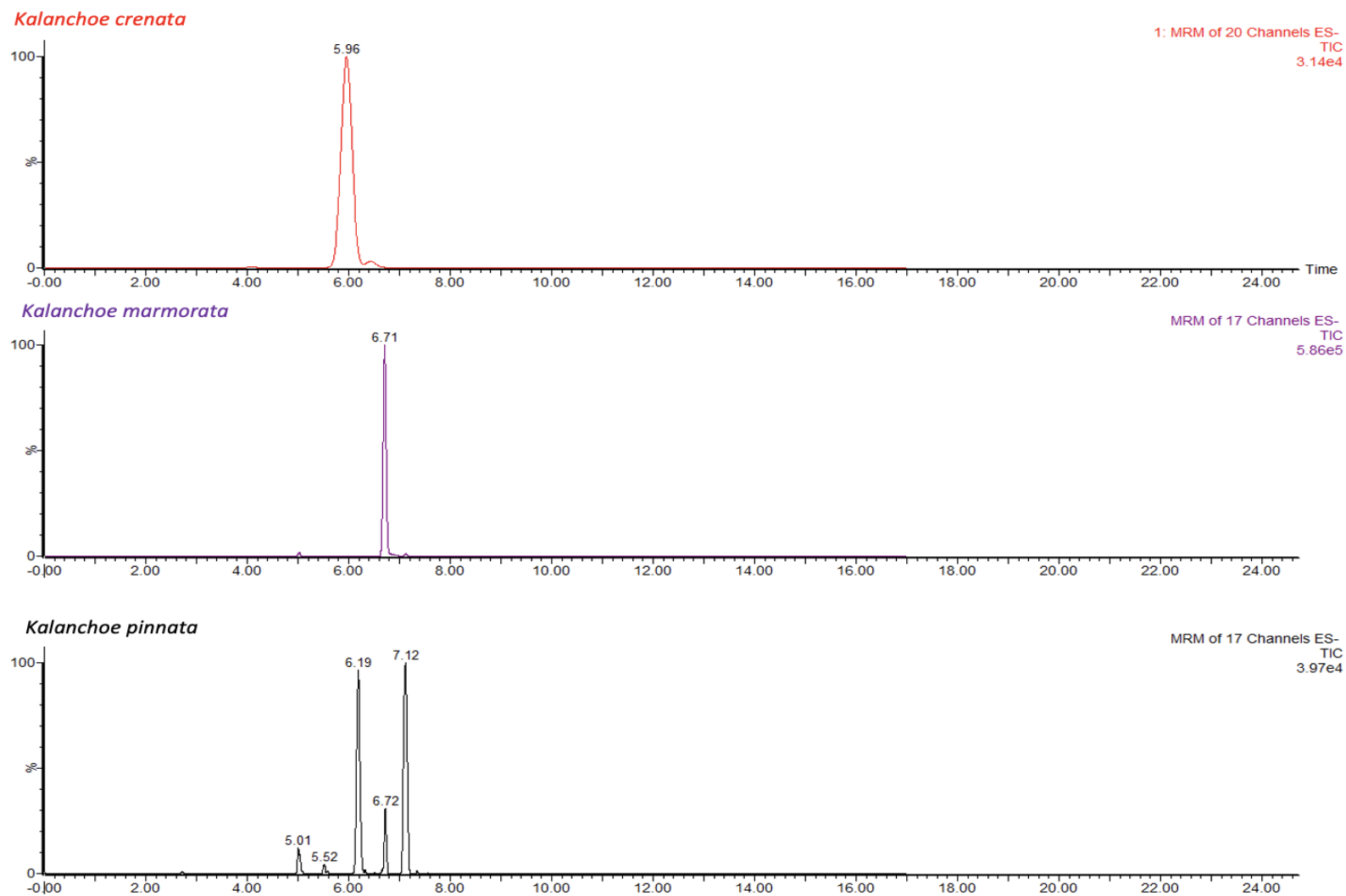
Para a espécie *K. crenata* foi possível observar um pico principal e outro menos intenso, sendo respectivamente, de m/z 609 e 593, descritos por Abdellaoui *et al.* (2010) como sendo um derivado de quercetina e campeferol 3-O-rutinosídeo. A m/z 609 apresenta também um fragmento de íon em m/z 301, típico de aglicona de quercetina; e a m/z 593 um fragmento em m/z 285, característico de aglicona de campeferol (**Figura 28**).

Com relação a espécie *K. marmorata*, observou-se somente um pico de m/z 609, o qual apresenta um fragmento de íon em m/z 301 (**Figura 29**) sugestivo de um derivado da quercetina ou uma pentose derivada de isoramnetina, como descrito por Abdellaoui *et al.* (2010).

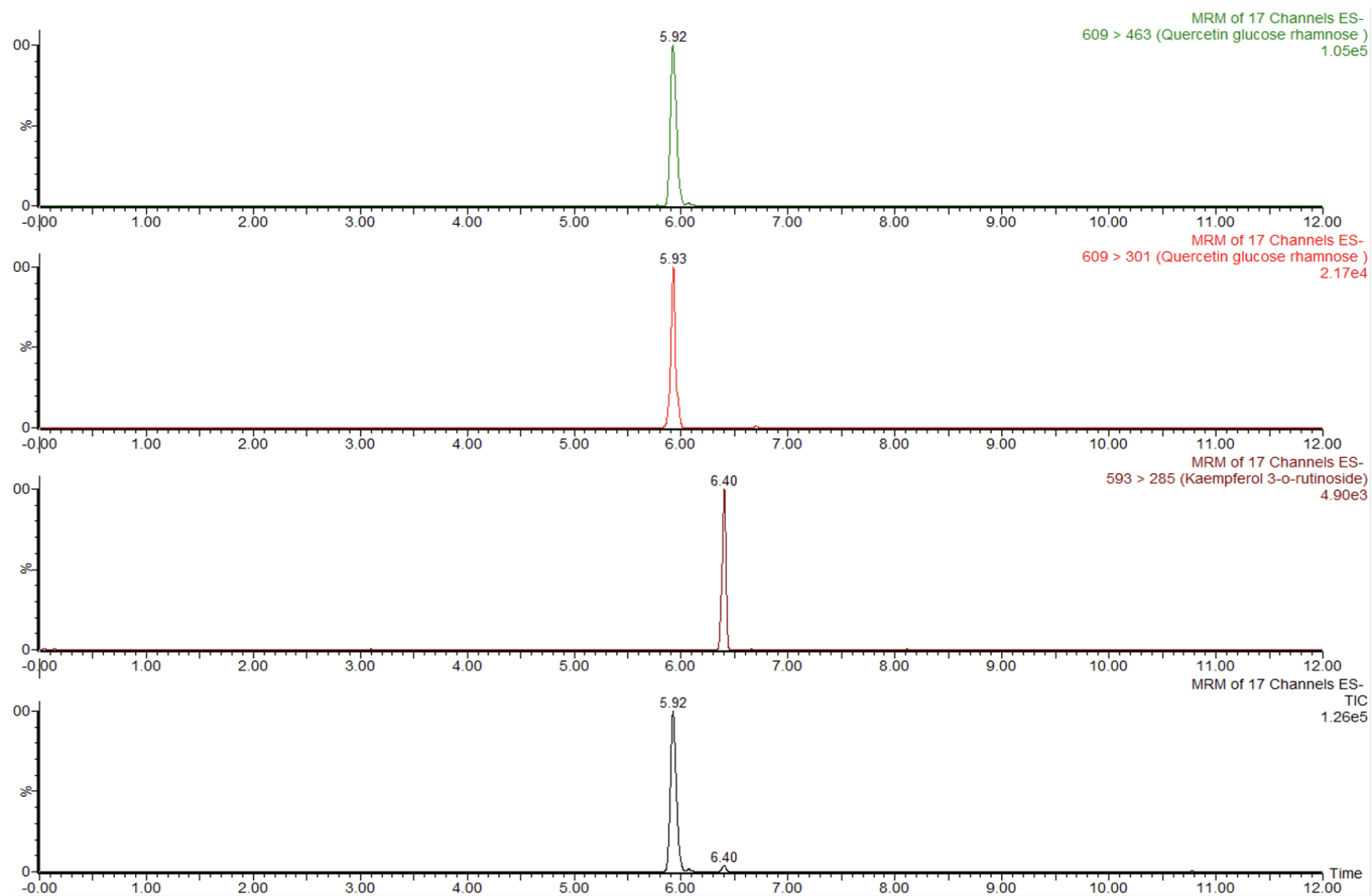
A espécie *K. pinnata* apresentou maior número de picos, cinco, dos quais três deles sugerem a presença de derivado de quercetina, assim como para as outras duas espécies, e outros dois sugestivos de quercetina 3-O- α -1-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (**Figura 30**), isolado pela primeira vez para a espécie por Muzitano *et al.* (2006) e suggestionado por Nascimento *et al.* (2018) para ser usado como marcador para *K. pinnata*. O pico apresentou m/z 508 com fragmentos de m/z 301 e m/z 179, apresentados por Abdellaoui *et al.* (2010) como componentes da fragmentação da quercetina 3-O- α -1-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo.

Diante do exposto, pode-se afirmar que os resultados obtidos contribuem para distinguir os metabólitos secundários presentes nas espécies, reforçando a possibilidade de ter como marcador químico da espécie *K. pinnata* o composto quercetina 3-O- α -1-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo, visto que as outras duas espécies não apresentam sugestões da presença desse derivado da quercetina (**Figura 31**).

Figura 27 - Cromatograma CLUE-EM de *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*.

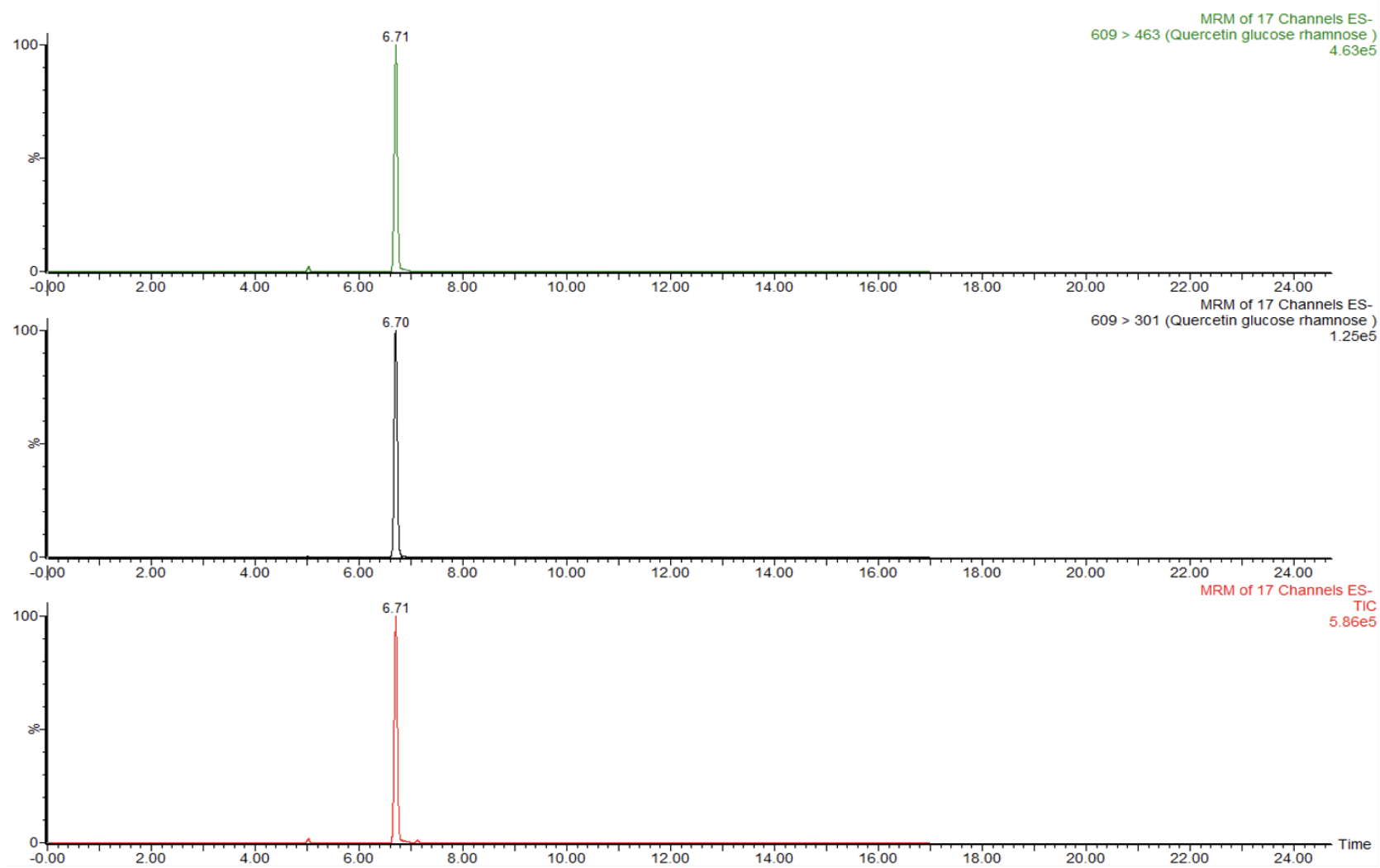


Fonte: a autora

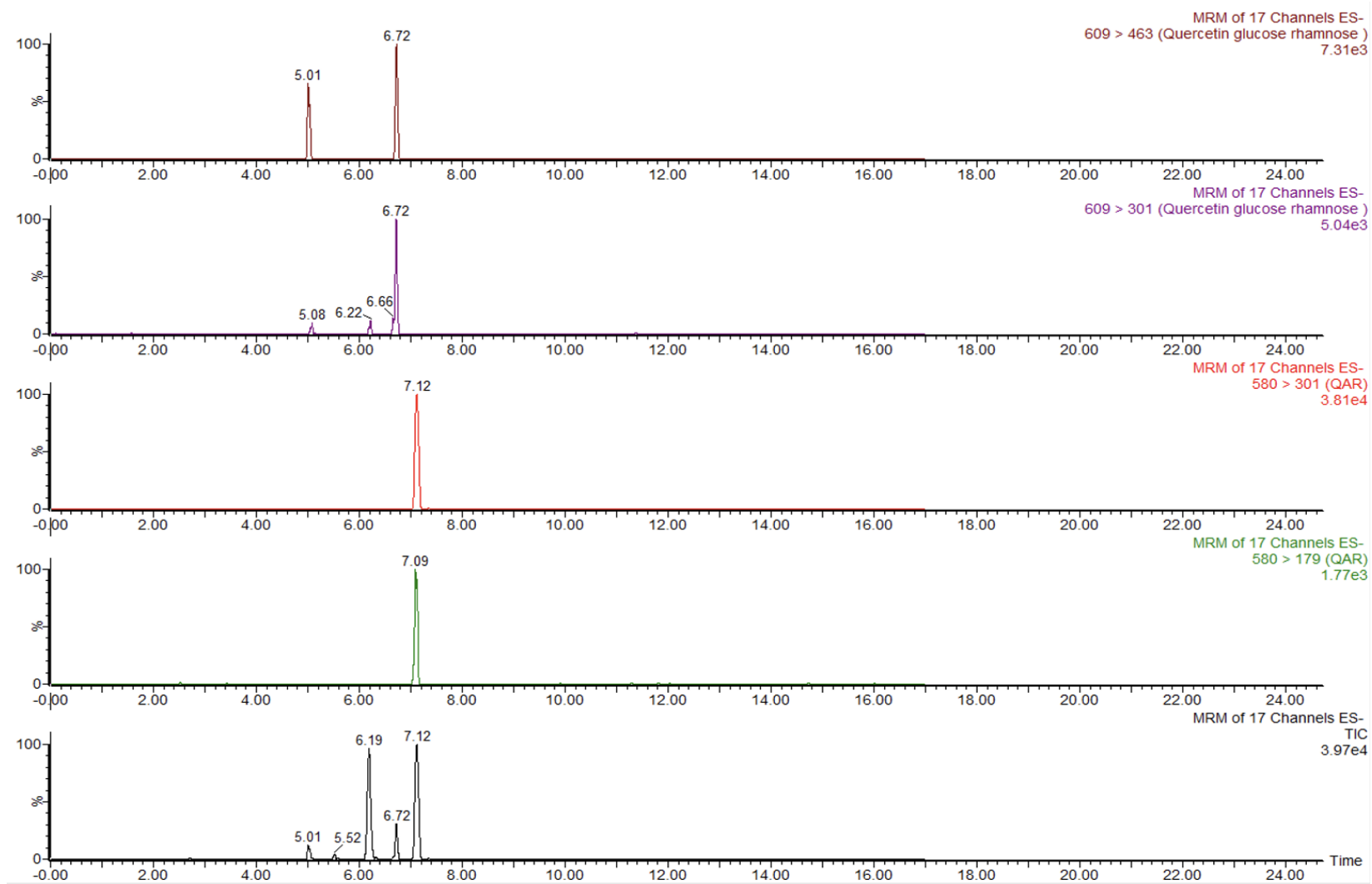
Figura 28 - Cromatograma CLUE-EM de *Kalanchoe crenata*.

Fonte: a autora

Figura 29 - Cromatograma CLUE-EM de *Kalanchoe marmorata*.

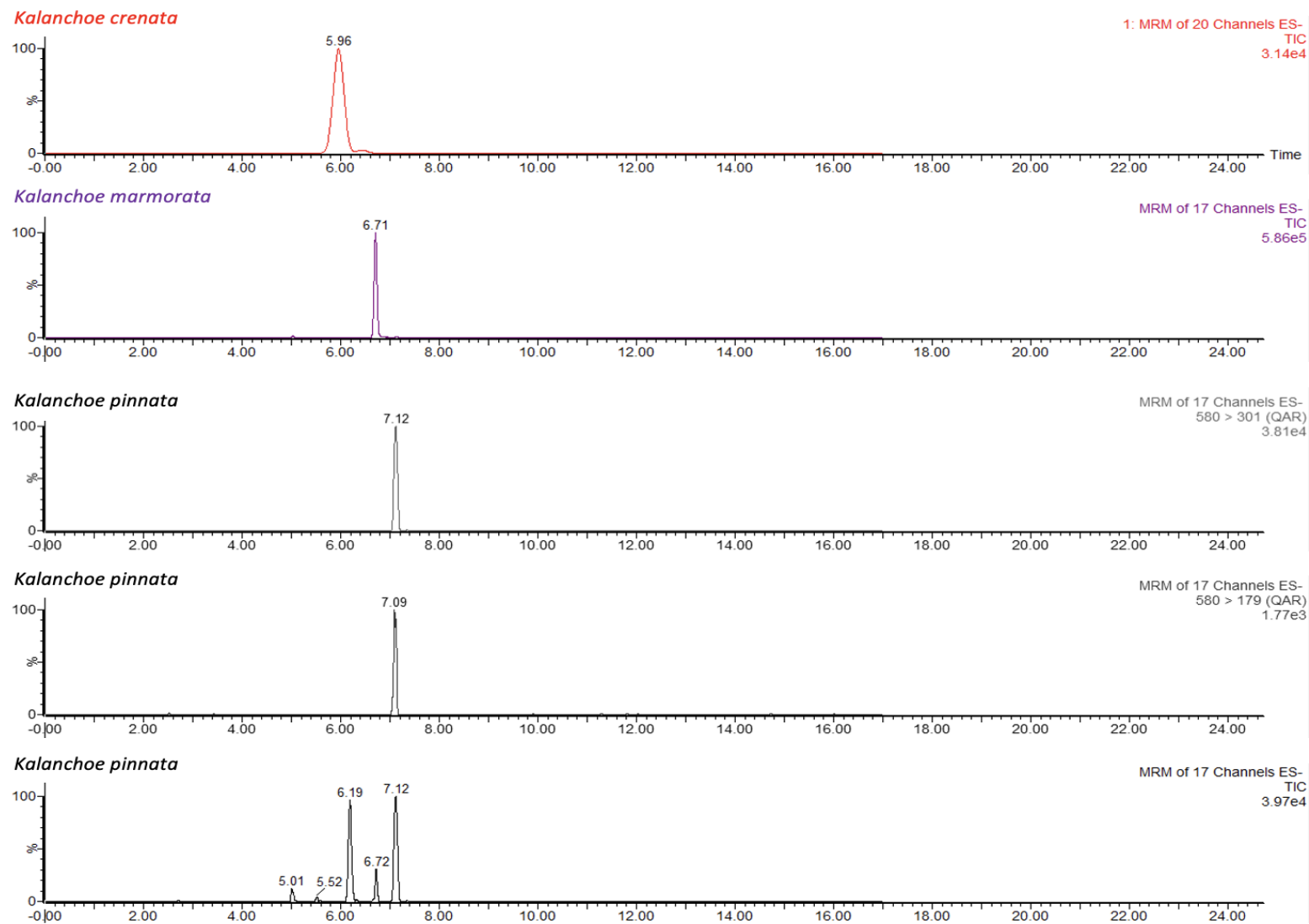


Fonte: a autora

Figura 30 - Cromatograma CLUE-EM de *Kalanchoe pinnata*.

Fonte: a autora

Figura 31 – Comparação entre os cromatogramas CLUE-EM evidenciando a sugestão da presença do QAR somente em *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: a autora.

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

Neste trabalho, o efeito ansiolítico dos extratos aquosos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* foi avaliado por meio do teste claro/escuro em peixes *Danio rerio*.

O peixe *Danio rerio*, comumente denominado peixe-zebra ou peixe paulistinha, é um teleósteo de água doce de pequeno porte, com comprimento médio variando entre 3 e 5 cm. Esta espécie exibe uma tendência natural para formar agregações sociais, conhecidas como cardumes, influenciadas por razões comportamentais e sociais, como a procura por alimento, proteção contra predadores e atividades reprodutivas. Sua diversidade comportamental o torna um modelo de estudo valioso em pesquisas neuroquímicas e comportamentais (Çelebi *et al.*, 2023; Gerlai, 2023).

Os peixes-zebra têm sido extensivamente utilizados como modelos animais em estudos de diversas patologias, incluindo epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, depressão e transtornos de ansiedade. Sua resposta a fármacos neurotrópicos os posiciona como um modelo para pesquisas farmacológicas (Gerlai, 2023).

A utilização desses peixes destaca-se por ser um intermediário entre invertebrados e mamíferos, apresentando vantagens como fácil manipulação, baixo custo de aquisição e manutenção, alta taxa de fecundidade, rápido desenvolvimento embrionário e transparência óptica, permitindo a observação direta de processos celulares e fisiológicos *in vivo* (Gerlai, 2023; Rinendyaputri *et al.*, 2023).

Apesar das diferenças morfológicas e neurofisiológicas em comparação com mamíferos, o peixe-zebra compartilha estruturas cerebrais análogas que desempenham funções semelhantes. Seu comportamento e resposta ao isolamento o posicionam como um modelo relevante para investigações sobre ansiedade e interações sociais (Gerlai, 2023).

Um dos modelos de ensaios utilizados para avaliação de comportamento tipo ansioso é o teste claro/escuro. Neste teste avalia-se o comportamento tipo ansioso moderado quando os peixes são expostos individualmente à diferentes ambientes, o lado claro e escuro. Sendo que, o aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário é um dos parâmetros que reflete um comportamento menos ansioso e é

um indicativo do efeito ansiolítico induzido pelas amostras avaliadas (Gerlai, 2023; Rinendyaputri *et al.*, 2023).

Assim, foi avaliado o comportamento associado ao efeito ansiolítico e à atividade locomotora do peixe. Desta forma, foram analisados o tempo de permanência no lado claro do aquário, o tempo de latência para explorar o lado escuro do aquário (medida da espontaneidade para explorar novos ambientes), e o número de transições entre os compartimentos claro e escuro para cada peixe.

O clonazepam, utilizado como controle positivo, é o agente ansiolítico mais comumente empregado no tratamento dos transtornos de ansiedade. O esperado seria um aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário para o grupo de animais previamente expostos ao fármaco, quando comparado com o grupo controle. Porém este não foi o resultado obtido (**Figura 32**) e pode-se justificar isso devido a perda de animais durante a experimentação, reduzindo o n amostral.

Inicialmente, foram analisadas diferentes concentrações das amostras das três espécies de *Kalanchoe* com a finalidade de descartar algum efeito letal ou sedativo. Com isto, utilizou-se duas concentrações para cada extrato: 1g/L e 0,1g/L.

Os ensaios realizados com as concentrações selecionadas não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, não sendo possível a confirmação de uma ausência de efeito ansiolítico. Conforme mencionado acima, com o número de animais reduzidos obteve-se restrição na interpretação dos dados. Assim, sugere-se a continuidade desses estudos afim de confirmar ou refutar primeiras impressões aqui obtidas.

Apesar das limitações, pode-se identificar que o grupo de peixes expostos ao extrato de *K. pinnata* na concentração de 0,1g/L apresentou uma redução no tempo de latência, sendo o comportamento semelhante ao verificado pela administração do clonazepam. Porém, não foram observadas diferenças significativas no número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro e no tempo de permanência no lado claro após (**Figura 32, b**), restringindo a interpretação e limitando a análise.

Estudos anteriores já avaliaram o potencial ansiolítico da espécie *K. pinnata*, seus efeitos analgésicos, bem como o potencial antidepressivo de *K. crenata*, sendo todos esses estudos feitos em modelo animal de roedores.

Ahmed (2012) apresenta que o potencial analgésico de frações etanólicas de folha de *K. pinnata* foi avaliado para ações farmacológicas periféricas usando torção induzida por ácido acético e teste de dor persistente induzido por Formalin, nos quais

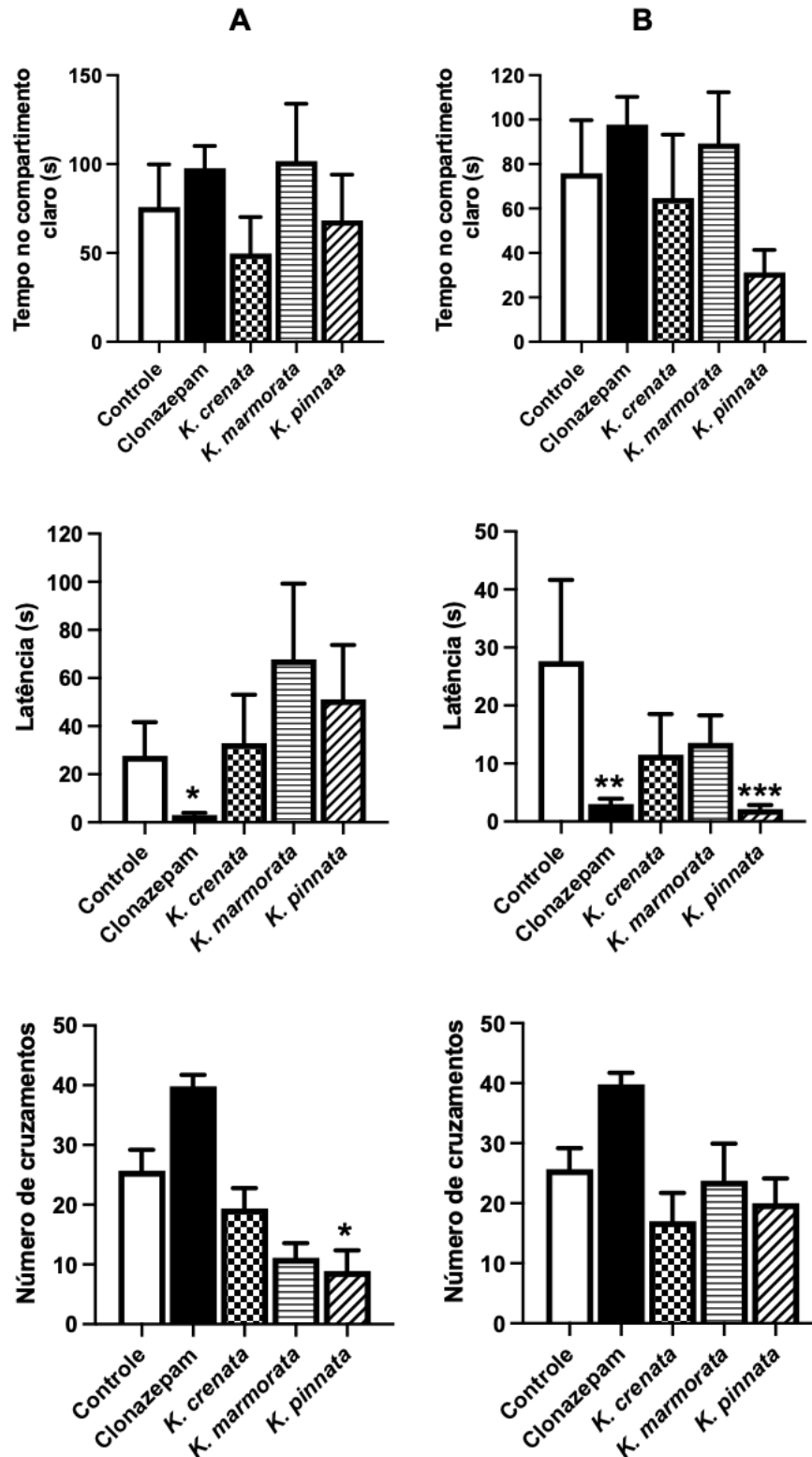
a fração, nas doses de 400 mg/kg de peso corporal, exibiu uma ação analgésica significativa de maneira dose-dependente. Além disso, o mesmo estudo apontou que as propriedades sedativas e ansiolíticas das frações foram investigadas usando modelos comportamentais de roedores, como teste em campo aberto e teste de labirinto em cruz elevada, aos quais a fração na dose de 400 mg/kg, foi verificada a supressão dependente da dose da atividade motora. Considerando o comportamento exploratório em testes de campo aberto e no teste de labirinto em cruz elevada, o extrato aumentou a exploração e o tempo gasto pelos camundongos tratados em braços abertos de maneira semelhante à do medicamento de referência diazepam.

Em relação a *K. crenata*, Kukuia *et al.* (2015) descrevem que, usando um extrato da espécie obtido apenas através da turbólise das folhas frescas, tanto no teste de nado forçado quanto no teste de suspensão da cauda, realizado com camundongos, o extrato induziu um declínio na imobilidade (dose de 100mg/kg) indicativo de efeito semelhante a antidepressivos. Ademais, o extrato (dose de 30mg/kg) aumentou os escores de natação e escalada, sugerindo possível interação com os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos.

Acrescentado a isso, já foram evidenciadas as propriedades calmantes e antidepressivas de certos flavonoides, tais como a apigenina e a quercetina, que se conectam seletiva e fortemente aos receptores benzodiazepínicos. Adicionalmente, múltiplos estudos confirmaram o envolvimento desses compostos na regulação dos receptores GABA_a, além de exibirem efeitos sedativos e anticonvulsivantes (Wasowski e Marder, 2012; Wang, *et al.* 2023) É importante destacar que os polifenóis podem agir como agentes calmantes devido a certas características químicas, como a lipofilia, que facilita sua penetração na barreira hematoencefálica (Qiu *et al.*, 2018). Uma vez, neste estudo, confirmado a presença dessa classe de metabólitos secundários nas três espécies de *Kalanchoe*, reforça-se a necessidade de continuidade dos estudos em relação a esta potencial atividade biológica.

Tem sido demonstrado por meio de modelos animais de ansiedade, que diferentes tipos de extratos de espécies de *Kalanchoe* exibem propriedades ansiolíticas. As diferenças entre os resultados aqui obtidos e os estudos da literatura, podem ser devidas aos modelos animais empregados, às doses avaliadas, à via de administração da amostra e o número de animais do estudo.

Figura 32 – Efeitos dos extratos aquosos de *K. crenata*, *K. marmorata* e *K. pinnata* – 1g/L (A) e 0,1g/L (B) -no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=9 animais/grupo), no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro.



Fonte: A autora.

Legenda: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).

6 CONCLUSÕES

Este estudo forneceu um perfil fitoquímico abrangente e *insights* sobre as propriedades antioxidantes de *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe marmorata* e *Kalanchoe pinnata*, melhorando nossa compreensão de seu potencial medicinal. Através de análises histoquímicas, de CCD-AP e análises quantitativas detalhadas, incluindo técnicas avançadas de UHPLC-UV e UPLC-MS, foi evidenciada a presença de perfis químicos distintos, demonstrando também a variabilidade significativa nos conteúdos fenólicos e flavonoides entre essas espécies. Esta variabilidade sugere diferenças nas suas capacidades antioxidantes e potenciais benefícios terapêuticos, sublinhando a necessidade de mais investigação sobre os seus papéis ecológicos específicos e aplicações farmacológicas.

A integração do estudo de CCD-AP com o método Folin-Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos, juntamente com análises de UHPLC-UV e UPLC-MS para perfil detalhado de metabólitos, estabelece um novo padrão para investigações fitoquímicas dentro do gênero *Kalanchoe*. Isso oportuniza futuras pesquisas focadas na bioatividade e nos efeitos sinérgicos destes compostos, principalmente aprofundando investigações em relação aos seus potenciais ansiolíticos, uma vez que estes se mostraram promissores neste trabalho.

Os resultados deste estudo contribuem significativamente para o campo da pesquisa em plantas medicinais, propondo o gênero *Kalanchoe* como uma rica fonte de antioxidantes naturais e destacando o papel crítico da diversidade fitoquímica no desenvolvimento de potenciais aplicações para a saúde. Este trabalho não só amplia o escopo dos estudos fitoquímicos e farmacológicos dentro do gênero, mas também reforça a importância da integração de diversas técnicas analíticas para uma compreensão mais abrangente dos recursos medicinais vegetais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, H. S. Anatomical traits of some species of *Kalanchoe* (Crassulaceae) and their taxonomic value. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 57, n. 1, 2012.
- ADAM M. *et al.* In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of 18 Plants from the Erkowit Region, Eastern Sudan. **Nat Prod Bioprospecting**; 8:97-105, 2018.
- AHMED M. *et al.* Pharmacological evaluation of crude methanolic extract of *Kalanchoe pinnata* leaves. **Environ Toxicol Chem**; v. 95, n. 9, p. 1539-1545, 2013.
- AKENTIEVA, N.P. *et al.* The effect of plant extracts *Kalanchoe daigremontiana* and *Aloe arborescens* on the metabolism of human multiple myeloma cells. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, ed. 5, p. 13171-13186, 2021.
- AKULOVA-BARLOW, Z. *Kalanchoe*. **Cactus and Succulent Journal**, v. 81, p. 268-276, 2009.
- ALMEIDA, A.P. *et al.* Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent Lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, v. 66, p. 134-137, 2000.
- ALMEIDA, V. P. *et al.* Investigations on the morpho-anatomy and histochemistry of the European mistletoe: *Viscum album* L. subsp. album. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 4604, 2023.
- ALVES C.Q. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. **Applied Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 65-73, 2012.
- ANADOZIE *et al.* *Bryophyllum pinnatum* inhibits arginase II activity and prevents oxidative damage occasioned by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **Biomed Pharmacother**; 101:8-13, 2018
- ANDRADE, E *et al.* A Review of the Popular Uses, Anatomical, Chemical, and Biological Aspects of *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Genus of Plants Known as "Miracle Leaf". **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5574, 2023.
- ARAÚJO, C. R. R. *et al.* Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of *Myrciaria cauliflora*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 301-309, 2013.
- ARIAS-GONZÁLEZ *et al.* Cytotoxic effect of *Kalanchoe flammula* and induction of intrinsic mitochondrial apoptotic signaling in prostate cancer cells. **J Ethnopharmacol**; 222:133-147, 2018.
- ASIEDU-GYEKYE, I. J. *et al.* Short-term administration of an aqueous extract of *Kalanchoe integra* var. *crenata* (Andr.) Cuf leaves produces no major organ damage in Sprague-Dawley rats, **Journal of Ethnopharmacology**, V. 151, N. 2, 2014.

- ASIEDU-GYEKYE, I.J. *et al.* Comparative study of two *Kalanchoe* species: Total flavonoid and phenolic contents and antioxidant properties. **African Journal of Pure and Applied Sciences**, 2012.
- AWORTWE C. *et al.* In vitro evaluation of reversible and time-dependent inhibitory effects of *Kalanchoe crenata* on CYP2C19 and CYP3A4 activities. **Drug Metabolism Letters**, v. 9, p. 48-62, 2015.
- BACHMANN *et al.* Potential of *Bryophyllum pinnatum* as a detrusor relaxant: an in vitro exploratory study. **Planta Medica**; 83: 1274-1280, 2017.
- BERLINCK, R.G. *et al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Ames: Iowa State University**, v. 276, p. 121, 1976.
- BHANDARI, R. *et al.* Evaluation of phytochemical, antioxidant, and memory-enhancing activity of *Garuga pinnata* Roxb. **Bark and Bryophyllum pinnatum (Lam) Oken**. leaves. *Sci World J*, 2021.
- BHATTI *et al.* In vitro evaluation and comparison of antioxidant activities of various extracts of leaves and stems of *Kalanchoe pinnatum*. **Int J Green Pharm**; 6(4)340-347, 2012.
- BHAVSAR S. *et al.* A comparative pharmacognostical and phytochemical analysis of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. leaf extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 1519-1527, 2018.
- BHAVSAR, S.; CHANDEL, D. Cytotoxic and genotoxic effects of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. fresh leaf juice in the cultured human blood lymphocytes. **Drug Chem Toxicol**; 45:1:360-366, 2019.
- BOGUCKA-KOCKA, A *et al.* Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 4, p. 622-630, 2018.
- BOPDA, O.S.M. *et al.* Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. **J Ethnopharmacol**; 153(2):400-407, 2014.
- BORRÁS, S. *et al.* Medicinal Plants for Insomnia Related to Anxiety: An Updated Review. **Planta Med**. 87: 738–753, 2021.
- BORTOLUZZI, M. M., SCHMITT V., & MAZUR, C. E. Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Journal Research, Society and Development**, 9(1), 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada– RDC no 463, de 27 de janeiro de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>.

BRITES D, FERNANDES A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. **Front Cell Neurosci.** 17; 9:476. 2015 Dec. doi: 10.3389/fncel.2015.00476

BRUNING, M.C.R, MOSEGUI, G.B.G., VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

CASANOVA, J. M. *et al.* Differential Distribution of Flavonoids and Phenolic Acids in Leaves of *Kalanchoe delagoensis* Ecklon & Zeyher (Crassulaceae). **Microsc**, 26(5):1061-1068, 2020.

CHERNETSKYY, M. Structure of leaves and phenolic acids in *Kalanchoë daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier. **Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus = Ogródnictwo**, v. 17, n. 4, p. 137-155, 2018.

CHERNETSKYY, M.; WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E. Structure of *Kalanchoë pumila* Bak. leaves (Crassulaceae DC.). **Acta Agrobot**, 61(2), 2008.

COSTA *et al.* Quantification of Chemical Marker of *Kalanchoe Brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves by HPLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatograph and Related Technologies**, p. 795-800, 2015.

COSTA, S. *et al.* Potencial terapêutico das espécies de *Kalanchoe*: Flavonoides e outros metabólitos secundários. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 2151-2164, 2008.

de 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.

de ARAÚJO, E.R.D. *et al.* Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, 2019.

DEMARTINI, J.; PATEL, G.; FANCHER, T. L. Generalized Anxiety Disorder. **Annals of Internal Medicine**, 170(7), 2019.

DENEV, P.; KRATCHANOVA, M.; CIZ, M.; LOJEK, A.; VASICEK, O.; NEDELICHEVA, P.; BLAZHEVA, D.; TOSHKOVA, R.; GARDEVA, E.; YOSSIFOVA, L.; HYRSL, P.; VOJTEK, L. Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. **Food Chemistry**, v. 157, p. 37–44, 2014.

DUARTE, M.R.; ZANETI, C.C. Morfoanatomia de folhas de bálsamo: *Sedum dendroideum* **Revista Lecta, Bragança Paulista**, v. 20, n. 2, p. 153-160, 2002.

DUDONNE, S *et al.* Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

EFFAH-YEBOAH, E. *et al.* Effect of *Kalanchoe crenata* extract on renal and liver impairment, dyslipidemia and glycemia in streptozotocin induced diabetic rats. **Annual Research & Review in Biology**, p. 109-125, 2021.

ABDELLAOUI, S. *et al.* Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, p. 1329-1338, 2010.

ELANSARY, H.O. *et al.* Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, p. 214, 2018.

ELIZONDO-LUÉVANO, J.H. *et al.* In Vitro Effect of *Kalanchoe daigremontiana* and Its Main Component, Quercetin against *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **Iranian Journal of Parasitology**, n. 16, n. 3, p. 394-401, 2021.

FERNANDES, J.M. *et al.* *Bryophyllum pinnatum* markers: CPC isolation, simultaneous quantification by a validated UPLC-DAD method and biological evaluations. **J Pharm Biomed Anal.** 193, 2021.

FERNANDES, J.M. *et al.* Inhibitory effects of hydroethanolic leaf extracts of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) against Local Effects Induced by *Bothrops jararaca* Snake Venom. **Plos one**, v. 11, ed 12, p. 1-20, 2016.

FERNANDES, J.M. *et al.* *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 4, 2019.

FERREIRA, R.T. *et al.* Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

FIRMO, W.C.A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, 2011.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2023.

FONSECA, A.G. *et al.* In Vivo and In Vitro Toxicity Evaluation of Hydroethanolic Extract of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves. **J Toxicol.**, 2018.

FOSTER, A.S. Practical plant anatomy. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRIMPONG-MANSO *et al.*, Micro and macro element composition of *Kalanchoe integra* leaves: an adjuvant treatment for hypertension in Ghana. **International Journal of Hypertension**, v. 2015, 2015.

FURER, K. *et al.* *Bryophyllum pinnatum* and Related Species Used in Anthroposophic Medicine: Constituents, Pharmacological Activities, and Clinical Efficacy. **Planta Med**, 82:930-941, 2016.

GABE, M. Techniques histologiques. Paris: Masson et Cie, 1968.

GARCIA-PEREZ *et al.* From ethnomedicine to plant biotechnology and machine learning: the valorization of the medicinal plant *Bryophyllum* sp. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 444, p. 1-23, 2020.

GARCÍA-PÉREZ, P.I *et al.* The combination of untargeted metabolomics and machine learning predicts the biosynthesis of phenolic compounds in *Bryophyllum* medicinal plants (Genus *Kalanchoe*). **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2430, 2021.

GARCÍA-SOGO, B. *et al.* Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. **Plant Cell Rep**, 29(1):61-77, 2009.

GBIF - GBIF Occurrence. Download 10.15468/dl.3mhrpz, 2023.

GOMES, D.C.O. *et al.* Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 137(4):613-618, 2010.

GOTOH, E. *et al.* Stomatal response to blue light in crassulacean acid metabolism plants *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana*, **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1367-1374, 2019.

HARA, K. *et al.* Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in brief*, v. 17, p. 870-875, 2018.

HEGAZY, M.M. *et al.* Biological and chemical evaluation of some African plants belonging to *Kalanchoe* species: Antitrypanosomal, cytotoxic, anti-topoisomerase I activities and chemical profiling using ultra-performance liquid chromatography/ quadrupole-time-of-flight mass spectrometer. **Pharmacognosy Magazine**, v. 17, p. 6-15, 2021.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2326–2331, 2012.

HERRANDO-MORAIRA, S. *et al.* Global distribution patterns and niche modelling of the invasive *Kalanchoe × houghtonii* (Crassulaceae). **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

HERRERA *et al.* Plantlet recruitment is the key demographic transition in invasion by *Kalanchoe daigremontiana*. **Population Ecology**, v. 54, n. 1, p. 225-237, 2011.

HILLIS, W. E.; SWAIN, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II.—The analysis of tissues of the Victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 135-144, 1959.

HSIEH, Y.J. *et al.* *Kalanchoe tubiflora* extract inhibits cell proliferation by affecting the mitotic apparatus. **BMC Complement Altern Med**, 12(59), 2012.

INFANTE, J. *et al.* Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 92, 2013.

JAISWAL, S.; CHAWLA, R.; SAWHNEY, S. *Kalanchoe pinnata* - a Promising Source of Natural Antioxidants. **European Journal of Medicinal Plants**, V. 4, N. 10, P. 1210-1222, 2014.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book, p. 41-193, 1940.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: A review. **Pharmacognosy Review**, v.3, n. 6, p. 364-375, 2009.

KAMGANG, R. *et al.* Effect of methanolic fraction of *Kalanchoe crenata* on metabolic parameters in adriamycin-induced renal impairment in rats. **Indian J Pharmacol**, 44(5):566-570, 2012.

KENDERSON, C.A. *et al.* Phytochemical and Pharmacological Evaluation Of Nigerian *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Stem-Bark. **J Chem Soc Nigeria**, 46(4):0751-0756, 2021.

KIM, Y.; JEON, S. W. Neuroinflammation and the immune-kynurenine pathway in anxiety disorders. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 5, p. 574-582, 2018.

KOŁODZIEJCZYK- CZEPAS, J.; STOCHMAL, A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. **Phytochem. Rev.**, v. 16, p. 1155–1171, 2017.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. *et al.* Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharm Biol.**, v. 54, n. 12, p. 3182-3188, 2016.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. *et al.* Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors – in vitro and in silico study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 141-150, 2017.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. *et al.* Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* modulate the enzymatic activity of plasmin - In vitro and in silico analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1591-1600, 2018.

KUKUIA, K.K. *et al.* Phytotherapy of experimental depression: *Kalanchoe integra* var. *crenata* (Andr.) Cuf leaf extract. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, n. 1, p. 26, 2015.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 726-732, 2005.

LAI, Z.R. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Kalanchoe gracilis* (L.) DC stem in mice. **Am J Chinese Med**, 38(3):529-546, 2010.

LAI, Z.R. *et al.* Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiproliferative Activities of *Kalanchoe gracilis* (L.) DC Stem. **Am J Chinese Med**, 39(6):1275-1290, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas exóticas cultivadas. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 223-223, 2008.

MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas Medicinais: a Necessidade de estudos Multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429- 438, 2002.

MAJAZ, A.Q. *et al.* Evaluation of Antimicrobial activity of Roots of *K. pinnata*. **Int J Pharmacol Bio Sci**, 5(1):93-96. 2011a.

MAJAZ, A.Q. *et al.* The Miracle Plant (*Kalanchoe pinnata*): A Phytochemical and Pharmacological Review. **Int J Res Ayurveda Pharm**, 2(5):1478-1482, 2011b.

MANFRON, J. Farmacobotânica: uma ferramenta importante para a detecção de adulterações em matérias-primas vegetais. In: BARATTO, L. C. **A Farmacognosia no Brasil [livro eletrônico]**: memórias da sociedade brasileira de farmacognosia. 1 ed. Petrópolis, RJ, 2021.

MARQUES, A.F. *et al.* Evaluation of consumption of medicinal plants by patients undergoing cancer treatment. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 5, p. 44557- 44573, 2021.

MATTOS, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, nov. 2018.

MAYORGA, O.A.S. *et al.* *Kalanchoe brasiliensis* Cambess., a Promising Natural Source of Antioxidant and Antibiotic Agents against Multidrug-Resistant Pathogens for the Treatment of Salmonella Gastroenteritis. **Oxid Med Cell Longev**, 2019.

METCALFE, C. R. *et al.* Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses. **Anatomy of the Dicotyledons:**

leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses., 1950.

MILAD, R., EL-AHMADY, S., SINGAB, A.N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. **Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p. 86-104, 2014.

MISHRA, R.; POUNIKAR, Y.; GANGWAR, M. Extraction, Phytochemical screening and quantitative determination of phenols and flavonoids in extract of *Kalanchoe pinnata* and *Pongamia pinnata*. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 192-196, 2019.

MOLINA, G.A. *et al.* Green synthesis of Ag nanoflowers using *Kalanchoe daigremontiana* extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 141-149, 2019.

MORA-PÉREZ, A.; HERNÁNDEZ-MEDEL, M.D.R. Anticonvulsant activity of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) stems and roots in mice: A comparison to diazepam. **Neurología**, 31(3):161-168, 2016.

MOREIRA, N.S. *et al.* Comparative anatomy of leaves of *Kalanchoe pinnata* and *K. crenata* in sun and shade conditions, as a support for their identification. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 929-936, 2012.

MOURÃO, R.H.V. *et al.* Antiinflammatory Activity and Acute Toxicity (LD50) of the Juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Comb.) Leaves Picked Before and During Blooming. *Phytother Res*, 13: 352-354, 1999.

MUZITANO, M.F. *et al.* Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial 131 flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 132-137, 2011.

NASCIMENTO, L.B.S. *et al.* Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Pers. (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, p. 391-399, 2013.

NASCIMENTO, L.B.S. *et al.* Optimization of Aqueous Extraction from *Kalanchoe pinnata* Leaves to Obtain the Highest Content of an Anti-inflammatory Flavonoid Using a Response Surface Model. **Phytochem Anal**, 29(3):308-315, 2018.

NGUELEFACK, T. B. *et al.* Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 70-75, 2006.

NGUELEFACK, T. B. *et al.* Analgesic properties of the aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 18, n. 5, p. 385-388, 2004.

NIELSEN, A. H.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. Li. Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. **Phytochemistry**, v. 66, n. 24, p. 2829-2835, 2005.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368–373, 1964.

OKWU, D.E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 357-361, 2006.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. Farmacognosia: Identificação de Drogas Vegetais, Atheneu, 2014.

OUFIR, M. *et al.* Quantification of bufadienolides in *Bryophyllum pinnatum* leaves and manufactured products by UHPLC-ESIMS/MS. **Planta Medica**, v. 81, p. 12-13, 1190-1197, 2015.

PALUMBO, A. *et al.* Potential therapeutic effects of underground parts of *Kalanchoe gastonis-bonnierei* on benign prostatic hyperplasia. **Evid Based Complementary Altern Med**, 2019.

PATIL, S.B. *et al.* Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* in streptozotocin-induced diabetic rats by glucose independent insulin secretagogue action. **Pharm Biol**, 51(11):1411-1418, 2013.

PELLEGRINI, N. *et al.* Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants Part A**, v. 299, p. 379-89, 1999.

POWO - Plants of the World Online. *Kalanchoe*. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/>. Acesso em: abril de 2023.

PRIOR, R. L.; WU, X; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QUINTERO, E.J. *et al.* Evaluation of the Leaf Extracts of *Kalanchoe Pinnata* and *Kalanchoe Daigremontiana* Chemistry, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 32, n. 5, p. 45-54, 2021.

RADWAN-PRAGLOWSKA, J. *et al.* Fungal Chitosan-Derived Biomaterials Modified with *Kalanchoe pinnata* as Potential Hemostatic Agents—Development and Characterization. **Polymers**, v. 13, n. 8, p. 1300, 2021.

RICHWAGEN, N. *et al.* Antibacterial activity of *Kalanchoe mortgagei* and *K. fedtschenkoi* against ESKAPE pathogens. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 67, 2019.

ROCHA, N. A. *et al.* A literature review on the use of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) in the treatment of Generalized Anxiety Disorder. Research, **Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33-36, 1972.

RUFINO, M.D.S.M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa Agroindústria

SARKAR, R. *et al.* Antimicrobial properties of *Kalanchoe blossfeldiana*: a focus on drug resistance with particular reference to quorum sensing-mediated bacterial biofilm formation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 67, p. 951–962. 2015.

SASS, J.E. Response of meristems of seedlings to benzene hexachloride used as a seed protectant. **Science**, v. 114, n. 2966, p. 466-466. 1951.

SHAH, M. & HOSSAIN, M. Total flavonoids content and biochemical screening of the leaves of tropical endemic medicinal plant *Merremia borneensis*. **Arabian Journal of Chemistry**. 7. 2011.

SHRUTI, B. *et al.* A comparative pharmacognostical and phytochemical analysis of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. leaf extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 1519-1527, 2018.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGAB, A.B. *et al.* Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, Family Crassulaceae. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 49, n. 1, p. 1-5, 2011.

SMITH, G.F.; FIGUEIREDO, E.; WYK, A.E. Chapter 4 - The Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Southern Africa, **Academic Press**, P. 23-28, 2019.

SOARES, J.R. *et al.* Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, 26, p. 469. 1997.

SOBREIRA, F. *et al.* Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and ethyl acetate fraction from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, 2017.

STAHL, S. Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. 4. ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2021.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. *et al.* Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines. **Planta Medica**, v. 86, p. 239-246, 2020.

TELEANU, D. M. *et al.* An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 5938, 2022.

TROUBAT R. *et al.* Neuroinflammation and depression: A review. **Eur J Neurosci**.53(1):151-171. 2021 Jan. doi: 10.1111/ejn.14720.

ÜRMÉNYI, F.G. *et al.* Anti-HSV-1 and HSV-2 flavonoids and a new kaempferol triglycoside from the medicinal plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, 1707-1714, 2016.

YANG, X. *et al.* A. The *Kalanchoë* genome provides insights into convergent evolution and building blocks of crassulacean acid metabolism. **Nat. Commun.** 8, 1899. 10.1038/s41467-017-01491-7. 2017.

ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. *et al.* Vitamin C and aroma composition of fresh leaves from *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 19786, 2019.

ZHENG, Z. *et al.* Neuroinflammation induces anxiety-and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. **Brain, behavior, and immunity**, v. 91, p. 505-518, 2021

APÊNDICE A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA

SEI/UEPG - 1386630 - Carta

22/05/2023 10:11



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA

CARTA DE APROVAÇÃO

Protocolo UEPG – 23.000015025-2

Título – Investigação química e farmacológica dos efeitos de extratos de *Kalanchoe sp.* (Crassulacea) em modelo de ansiedade.

Interessado – Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

e-mail: flaviobeltra@uepg.br

Data de Entrada – 08/03/2023

Resultado: Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizado o uso de 242 (duzentos e quarenta e dois) Danio rerio – zebrafish, sexo indeterminado.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Ricardo Vicari, Membro da Comissão - PROPESP/CEUA**, em 31/03/2023, às 09:46, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1386630** e o código CRC **B93B05DA**.

23.000015025-2

1386630v2

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS DURANTE O MESTRADO



Review

A Review of the Popular Uses, Anatomical, Chemical, and Biological Aspects of *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Genus of Plants Known as “Miracle Leaf”

Evelyn Assis de Andrade ¹, Isadora Machinski ¹, Ana Carolina Terso Ventura ¹, Sarah Ainslie Barr ², Airton Vicente Pereira ¹, Flávio Luis Beltrame ¹, Wendy Karen Strangman ² and Robert Thomas Williamson ^{2,*}

¹ Pharmaceutical Science Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84030-900, PR, Brazil; evelyn.aandrade@gmail.com (E.A.d.A.); isadora.machinski@gmail.com (I.M.); anacarolinatervent@gmail.com (A.C.T.V.); airtonvp@uepg.br (A.V.P.); flaviobeltra@gmail.com (F.L.B.)

² Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Wilmington, Wilmington, NC 28409, USA; sab9514@uncw.edu (S.A.B.); strangmanw@uncw.edu (W.K.S.)

* Correspondence: williamsonr@uncw.edu

Abstract: Species of the genus *Kalanchoe* have a long history of therapeutic use in ethnomedicine linked to their remarkable healing properties. Several species have chemical and anatomical similarities, often leading to confusion when they are used in folk medicine. This review aims to provide an overview and discussion of the reported traditional uses, botanical aspects, chemical constituents, and pharmacological potential of the *Kalanchoe* species. Published scientific materials were collected from the PubMed and SciFinder databases without restriction regarding the year of publication through April 2023. Ethnopharmacological knowledge suggests that these species have been used to treat infections, inflammation, injuries, and other disorders. Typically, all parts of the plant are used for medicinal purposes either as crude extract or juice. Botanical evaluation can clarify species differentiation and can enable correct identification and validation of the scientific data. Flavonoids are the most common classes of secondary metabolites identified from *Kalanchoe* species and can be correlated with some biological studies (antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial potential). This review summarizes several topics related to the *Kalanchoe* genus, supporting future studies regarding other unexplored research areas. The need to conduct further studies to confirm the popular uses and biological activities of bioactive compounds is also highlighted.

Keywords: traditional use; chemical composition; botanical description; pharmacological activities; natural products; bioactive compounds; *Kalanchoe*; Crassulaceae



Citation: Assis de Andrade, E.; Machinski, I.; Terso Ventura, A.C.; Barr, S.A.; Pereira, A.V.; Beltrame, F.L.; Strangman, W.K.; Williamson, R.T. A Review of the Popular Uses, Anatomical, Chemical, and Biological Aspects of *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Genus of Plants Known as “Miracle Leaf”. *Molecules* **2023**, *28*, 5574. <https://doi.org/10.3390/molecules28145574>

Academic Editors: Enrique Barrajon-Catalán, Wilmer Perera and Kumudini M. Meepagala

Received: 19 June 2023

Revised: 15 July 2023

Accepted: 19 July 2023

Published: 21 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The Crassulaceae J. St.-Hil. family is composed of 36 genera [1]. Species of this family are distributed in Africa and Asia, predominantly in Madagascar and Arabia [2,3] but are also found in the Americas and in Australia (Figure 1) [4].

The genus *Kalanchoe* Adans (Heterotypic Synonyms: Baumgartenia Tratt., Bryophyllum Salisb., Crassuvia Comm. ex Lam., Geaya Costantin and Poiss., Kitchingia Baker, Meristostylus Klotzsch, Physocalycium Vest, and Vereia Andrews) belongs to the Crassulaceae family and comprises 179 accepted species [5]. The synonyms (according to Plants of the World Online, facilitated by the Royal Botanic Gardens) and number of occurrences worldwide (according to Global Biodiversity Information Facility) of the accepted species are shown in Table 1.

The effects of 35% trichloroacetic acid-Croton oil and 35% glycolic acid-Croton oil compared to 35% phenol-Croton oil Hetter's very heavy formula for deep chemical peel



Bruna Mikulis Lemes, PharmD, PhD,^a Aline da Silva Justo, PharmD, MSc,^a Erica Miyake Lin, BS,^b Anna Claudia M. O. Capote, PharmD,^a Anny K. L. Neves, PharmD,^a Isadora Machinski, PharmD,^a Airton V. Pereira, PharmD, PhD,^a Adriana Yuriko Koga, PharmD, PhD,^c Leandro C. Lipinski, VetD, PhD,^c Flavio Luis Beltrame, PharmD, PhD,^a Helio A. Miot, MD, PhD,^d and Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD^b

Key words: chemabrasion; chemexfoliation; chemical peels; collagen; Croton oil; emulsions; glycolic acid; Hetter's formula; neocollagenesis; phenol; phorbol esters; trichloroacetic acid.

To the Editor: Phenol-Croton oil peels are a well-established method for deep chemical skin rejuvenation.¹ Phenol induces epidermal and upper dermis coagulative necrosis (medium-depth peel), and when mixed with *Croton tiglium* oil (CO), the necrosis reaches the reticular dermis. This induces intense neocollagenesis, which is enhanced by the proinflammatory effects of phorbol esters (PE) from CO.^{2,5} Phenol may be underutilized due to awareness of hypopigmentation and cardiac arrhythmia risks.^{1,4} Here, we investigated the potential of inducing deep peeling with CO mixed with noncardiotoxic chemicals: glycolic acid (GA) or trichloroacetic acid (TCA).

Formulas containing 1.6% CO in 35% phenol, 35% GA, or 35% TCA as active ingredients (Delasco) were mixed with 5% surfactant (Septisol, Steris) and water (inactive ingredients, negative control). Immediately after vigorous agitation of the dispersions, pH was measured and application was performed on 4 domestic pigs (2 male/2 female) aged 5 months

weighing 30 to 35 kg, after hair clipping and acetone degreasing, in 9 areas measuring 4 cm² using a saturated cotton swab with increasing pressure (30 circular strokes). Three areas were biopsied from each pig (D1, D7, and D21) for histopathological evaluation with hematoxylin and eosin staining. The D21 samples underwent picosirius red staining to assess neocollagenesis depth and density.

The TCA formula had the highest acidity (pH 1.97), followed by GA (pH 2.55) and phenol (pH 5.2). Phenol and TCA caused a solid white frosting, which was not observed for GA. The main histopathologic findings at D1, D7, and D21 are summarized in Table I. A greater depth and proportion of type III collagen was induced by phenol compared with GA and TCA. Additionally, GA promoted a superior depth of neocollagenesis compared with TCA (Fig 1).

Although the GA and TCA formulas were more acidic than the phenol formula, both promoted only superficial neocollagenesis, which was limited to the

From the Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil^a; Department of Dermatology, The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island^b; Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil^c; and Department of Dermatology, Unesp Medical School, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.^d

Funding sources: None.

IRB approval status: Reviewed and approved by the State University of Ponta Grossa IRB and Ethics Committee on the Use of Animals; approval #034/2017/CEUA/UEPG.

Correspondence and reprint requests to: Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD, Department of Dermatology, Rhode Island Hospital, 593 Eddy St, APC building, 10th Floor, Providence, RI 02903. E-mail: carlos_wambier@brown.edu; Twitter: @WambierMD.

J Am Acad Dermatol 2022;87:1227-9.

0190-9622/\$36.00

© 2022 by the American Academy of Dermatology, Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.07.023>

Mapping community pharmacy services in Brazil: a scoping review

Aline Ansbach Garabeli¹, Arcelio Benetoli², Gerusa Clazer Halila²,
Isadora Machinski², Fernanda Stumpf Tonin¹, Fernando Fernandez-Llimos³,
Roberto Pontarolo^{4*}

¹Pharmaceutical Sciences Postgraduate Programme, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil, ²Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, PR, Brazil, ³Laboratory of Pharmacology, Department of Drug Sciences, University of Porto, Porto, Portugal, ⁴Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

The delivery of clinical pharmacy services has been growing in Brazilian community pharmacies, and it is necessary to have a comprehensive understanding of the topic. This scoping review aimed to provide an overview of Brazilian studies about clinical pharmacy services in community pharmacies. Original research articles, with no restriction of time, study design, or patient's health condition, were included. Searches were conducted in PubMed, Scopus, Web of Science, Scielo, and Lilacs. Two reviewers conducted the screening, full-text reading, and data extraction independently. ROB and ROBINS-I were used for the assessment of quality. Charts and tables were built to summarise the data. Seventy-two articles were included. A diversity of study designs, number of participants, terms used, and outcomes was found. São Paulo and Sergipe States had the highest number of studies (n=10). Pharmacists' interventions were not fully reported in 65% of studies, and most studies presented an unclear risk of bias. Studies were very diverse, impairing the comparisons between the results and hindering their reproducibility. This review suggests using guidelines and checklists for better structuration of pharmacists' interventions as well as reporting results and measuring fidelity in future research.

Keywords: Community pharmacy services. Pharmacists. Pharmacy research. Terminology. Public Reporting of Healthcare Data.



Research Article

Study of the Antioxidant, Antimicrobial, and Wound Healing Properties of Raw Hydrolyzed Extract from Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*)

Rodrigo Tozetto, Beatriz Santos Rocha, Evelyn Assis de Andrade, Luiza Stolz Cruz, Rosana Letícia da Rosa, Isadora Machinski, Évelin Lemos de Oliveira, Jessica Raquel Borges Monteiro, Adriana Yuriko Koga, Leandro Cavalcante Lipinski, Eduardo César Meurer, Rodrigo Rezende Kitagawa, Flávio Luís Beltrame
... See fewer authors ^

First published: 25 September 2023 | <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300863>

[Read the full text >](#)

PDF TOOLS SHARE

Abstract

Oreochromis niloticus (Nile tilapia) skin is a by-product of Brazilian fish farming, rich in collagen. The present study aims to evaluate the wound healing, antioxidant, and antimicrobial potential of the raw hydrolyzed extract of Nile tilapia skin, as well as the identification of the main compounds. The *in vitro* activity was performed using antioxidant, antimicrobial and scratch wound healing assays. An *in vivo* experiment was performed to evaluate the wound healing potential. On days 1, 7, 14 and 21, the lesions were photographed to