



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Oscar Alejandro Santos Mayorga

**Perfil químico e potenciais antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório de extratos
hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae)**

Juiz de Fora
2017

Oscar Alejandro Santos Mayorga

Perfil químico e potenciais antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório de extratos hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvana Alves
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

Juiz de Fora
2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos Mayorga, Oscar Alejandro.

Perfil químico e potenciais antioxidante, antibacteriano e anti inflamatório de extratos hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae) / Oscar Alejandro Santos Mayorga. -- 2017.

151 f.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientador: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Kalanchoe brasiliensis*. 2. Flavonoides. 3. Antibacterianos. 4. Anti-Inflamatórios. 5. *Salmonella*. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Sousa, Orlando Vieira de, coorient. III. Título.

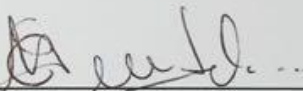
**Perfil químico e potenciais antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório
de extratos hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis*
Cambess. (Crassulaceae)**

Oscar Alejandro Santos Mayorga

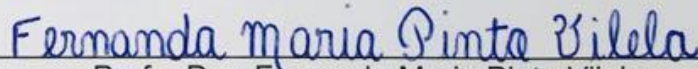
ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Silvana Alves

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

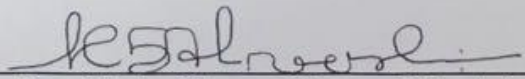
Aprovada em 20/02/2017



Profa. Dra. Elaine Minatel
Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Silvana Alves - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, todo poderoso, por ter colocado em meu caminho esta oportunidade e me guiado até o fim;

Aos meus pais, Oscar Armando Santos Guzmán e Clara Luz Mayorga de Santos, por todo o sacrifício que fizeram para eu poder concluir esta etapa da minha vida;

Ao meu irmão, José Armando Santos Mayorga, pelos suportes emocional e financeiro, auxiliando sempre nos momentos difíceis;

À Melissa Mariana Gómez, Bruno Zárate Gómez e Ernesto Navas Ruiz, pelo apoio emocional e por todas as lutas que tivemos que enfrentar durante este período de nossas vidas;

À família Cavalari, por todo apoio e por abrir as portas de sua casa, me permitindo ser parte dessa encantadora família. Desejo, de coração, muita prosperidade e bênçãos sobre vocês. Vocês são os melhores!

À Profa. Dra. Maria Silvana Alves, pela valentia de me aceitar como orientado sem se importar com o problema inicial das línguas (quando cheguei ao Brasil eu desconhecia o Português). Pelo auxílio, orientações e amizade durante os 24 meses do Programa, pois sem o seu esforço e a sua dedicação não seria possível o desenvolvimento deste estudo;

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, por todo o auxílio nas diversas etapas deste estudo e por ter me concedido a honra de ser meu Co-orientador;

À Profa. Dra. Elita Scio Fontes, pela grande colaboração e auxílio, essenciais para a realização do presente estudo;

Ao Jônatas Florencio Rodrigues, mestrando e parceiro nas atividades realizadas, especialmente pela amizade e pela participação na execução nos experimentos laboratoriais; desejo-lhe tudo de bom e que você se realize profissionalmente;

Aos Mestres Nícolas de Castro Campos Pinto e Renata de Freitas Mendes, doutorandos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia), pela amizade, interesse e disposição em me auxiliar. Sou muito grato a vocês e espero que alcancem todos os seus objetivos;

Aos amigos do Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora Carolina Feres Netto, Dionnata Martins Pedrosa e Ygor Ferreira Garcia da Costa, acadêmicos do Curso de Farmácia dessa Instituição, pela amizade e disposição em me auxiliar sempre que foi preciso. Espero que continuem pesquisando e nunca desistam de alcançar seus objetivos profissionais;

Aos Técnicos Administrativos em Educação (TAEs) Éder Luís Tostes, Fázia de Oliveira Sales e Jesús de Paula Sarmento, pelo auxílio nas atividades; pessoas boas a quem desejo saúde e prosperidade;

À Gabriella Araújo e Luciana Leitão, pela amizade e ajuda na revisão do Português. Desejo que se realizem profissionalmente e nunca desistam de seus objetivos; contêm comigo sempre!

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Arlem Martins de Rezende e Sullivan Ramos Moreira Andrade, por todo o auxílio, correrias e trâmites que foram necessários para a realização desta etapa, principalmente por eu ser estrangeiro e necessitar do suporte de ambos;

Ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC)-Organização dos Estados Americanos (OEA)/Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), pela concessão da bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro por meio do aporte de recursos no projeto "Potencial antimicrobiano de produtos naturais frente às amostras de referência e detentoras de determinantes de resistência de relevância clínica" (CDS-APQ-04680-10), o que viabilizou parcialmente a realização do presente trabalho;

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu Diretor e também colaborador deste estudo, Prof. Dr. José Otávio do Amaral Correa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu Coordenador Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, pela oportunidade e infraestrutura para realização de alguns dos experimentos de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior, Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora;

Finalmente, a todos os amigos que, direta ou indiretamente, deram sua colaboração e amizade, tornando o caminho mais fácil de percorrer;

Muito obrigado!

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Kalanchoe brasiliensis Cambess. (Crassulaceae DC.) é uma planta nativa do Brasil, popularmente conhecida como saião e tradicionalmente usada no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas. Os principais metabólitos secundários presentes nesta espécie vegetal são as substâncias fenólicas, em particular os flavonoides. Com base nestes dados, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição química e os potenciais antioxidante e antibacteriano *in vitro* e a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* de extratos hidroetanólicos das folhas de *K. brasiliensis*. Folhas frescas coletadas em janeiro (verão) e setembro (primavera) foram extraídas com soluções hidroetanólicas nas concentrações de 30% (EHJ30 e EHS30), 50% (EHJ50 e EHS50) e 70% (EHJ70 e EHS70) de etanol em água com auxílio de triturador mecânico. Estes extratos foram quimicamente caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD). Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria e a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), redução da complexação do fosfomolibdênio e co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A atividade antibacteriana foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo frente a oito cepas bacterianas de referência ATCC® e dez de rotina. Em seguida, procedeu-se ao estabelecimento da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e à classificação do efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático. A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada usando modelos de edema de orelha induzidos por óleo de Cróton, fenol e histamina, pela análise histológica e pela determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) e dos mediadores inflamatórios óxido nítrico (NO), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os espectros UV obtidos por CLAE-DAD sugerem a presença de flavonoides, especialmente flavonol e flavona. Os teores de fenóis e flavonoides totais variaram de 25,47 a 30,11 mg/g de extrato em equivalente de ácido tânico (EAT) e de 11,84 a 16,95 mg/g de extrato em equivalentes de rutina (ER), respectivamente. Os valores de CE₅₀ variaram de 58,08 \pm 15,87 a 257,70 \pm 79,47 μ g/mL e de 8,491 \pm 0,364 a 16,780 \pm 0,239 AAR% para os métodos do sequestro do radical livre DPPH• e de redução da complexação do fosfomolibdênio, nessa ordem. Os percentuais de inibição da peroxidação lipídica variaram de 37,51 \pm 0,47 a 44,46 \pm 0,84%. Em relação à atividade antibacteriana, todos os extratos mostraram-se ativos frente à *Salmonella* Choleraesuis (ATCC® 10708™) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™), com valores de CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. EHJ30, EHJ50, EHJ70 e EHS70 foram ativos frente à *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), com CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. EHJ70 e EHS70 inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 6538™), com CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. Com relação às cepas de rotina, todos os extratos foram ativos para *Salmonella* Enteritidis 1406591, 1418594 e 1628260 e para *Salmonella* spp. resistente à fluoroquinolona 1266695 e 1507788, com CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. EHJ30, EHJ50, EHJ70 e EHS70 inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) 1485279, 1605677, 1830466 e 1664534, com CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. EHS30 foi ativo frente à MRSA 1605677 e 1830466, com CIM de 5000 μ g/mL e efeito bacteriostático. Não foi possível determinar os valores de CBM dentro do gradiente de concentração estabelecido para nenhuma cepa testada. Quanto à atividade anti-inflamatória tópica *in vivo*, no edema de orelha induzido por óleo de Cróton os valores variaram de 74,63 a 85,07% e de 62,03 a 80,34% para a medida e para a massa do edema após 24 h do desafio, respectivamente. No edema de orelha induzido por fenol, os percentuais variaram de 96,46 a 96,73% e de 93,09 a 95,65% para medida e massa do edema, nessa ordem. Naquele induzido por histamina não foi observada diminuição estatística significativa. A inibição da MPO e NAG foi de 55,27 a 81,74% e de 69,04 a 80,82%, respectivamente. Para os mediadores inflamatórios, a inibição foi de 52,24 a 67,43%, de 1,68 a 22,78% e de 3,40 a 23,71%, para NO, IL-6 e TNF- α , nessa ordem. Os resultados obtidos sugerem que *K. brasiliensis* é uma fonte natural promissora de substâncias bioativas, especialmente da classe dos flavonoides, com elevado potencial anti-inflamatório tópico e atividade antibacteriana digna de ser explorada principalmente para tratar infecções causadas por cepas de *Salmonella*, destacando essa espécie vegetal como um alvo para descoberta de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: *Kalanchoe brasiliensis*. Flavonoides. Antibacterianos. Anti-Inflamatórios. *Salmonella*. *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina.

ABSTRACT

Kalanchoe brasiliensis Cambess. (Crassulaceae DC.), is a Brazilian native plant popularly known as "saião" and traditionally used in the treatment of inflammatory and infectious diseases. The major secondary metabolites present in this species are phenolic compounds, particularly flavonoids. Based on these data, the present study aimed to investigate the chemical composition and the *in vitro* antioxidant and antibacterial potentials and the *in vivo* topical anti-inflammatory activity of the hydroethanolic extracts *K. brasiliensis* leaves. Fresh leaves collected on January (summer) and September (spring) were extracted with a hydroethanolic solution in concentrations of 30% (HEJ30 and HES30), 50% (HEJ50 and HES50) and 70% (HEJ70 and HES70) of ethanol in water using a mechanical crusher. These extracts were chemically characterized by High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detection (HPLC-DAD). The total phenol and flavonoid contents were determined spectrophotometrically and the antioxidant activity was evaluated by the 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) free radical sequestration, the reduction of the phosphomolybdenum complex and the β -carotene/linoleic acid co-oxidation system assays. The antibacterial activity was determined by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the broth microdilution method against eight ATCC® reference strains and ten routine ones. Subsequently, the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was established and the bactericidal or bacteriostatic antibacterial effect was classified. The topical anti-inflammatory activity was evaluated using Croton-oil, phenol and histamine induced ear edema models, histological analysis, and determinations of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glycosaminidase (NAG) enzymes and nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) inflammatory mediators. The UV-spectra obtained by HPLC-DAD suggested the presence of flavonoids, specially flavonol and flavone. Total phenol and flavonoid contents ranged from 25.47 to 30.11 mg/g of tannic acid equivalent/g of extract (EAT) and from 11.84 to 16.95 mg/g of rutin equivalent/g of extract (ER), respectively. EC₅₀ values varied of 58.08 ± 15.87 to 257.70 ± 79.47 $\mu\text{g/mL}$ and 8.491 ± 0.364 to 16.780 ± 0.239 RAA% for the DPPH• free radical sequestration and phosphomolybdenum complex reduction methods, in this order. The percentages of inhibition of lipid peroxidation ranged from 37.51 ± 0.47 to $44.46 \pm 0.84\%$. In relation to the antibacterial activity, all extracts were active against *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) and *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 13311™), with MIC values of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. HEJ30, HEJ50, HEJ70 and HES70 were active against *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), with MIC of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. HEJ70 and HES70 inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 6538™), with MIC of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. In relation to the routine strains, all extracts were active against *Salmonella* Enteritidis 1406591, 1418594 and 1628260, and for *Salmonella* spp. fluoroquinolone-resistant 1266695 and 1507788, with MIC of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. HEJ30, HEJ50, HEJ70 and HES70 inhibited the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 1485279, 1605677, 1830466 and 1664534, with MIC of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. HES was active against MRSA 1605677 and 1830466, with MIC of 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect. It was not possible to determine the MBC values within the established concentration gradient for any strain tested. With regard to the *in vivo* topical anti-inflammatory activity, in Croton oil-induced ear edema the values ranged from 74.63 to 85.07% and 62.03 to 80.34% for the measurement and mass of the edema after 24 h of the challenge, respectively. In phenol induced ear edema, the percentages varied of 96.46 to 96.73% and 93.09 to 95.65% for the measurement and mass of the edema, in this order. Considering the edema induced by histamine, no significant statistical decrease was observed. The inhibition of MPO and NAG was 55.27 to 81.74% and from 69.04 to 80.82%, respectively. For the inflammatory mediators, the inhibition was from 52.24 to 67.43%, from 1.68 to 22.78% and from 3.40 to 23.71% for NO, IL-6 and TNF- α , in this order. The obtained results suggest that *K. brasiliensis* is a promising natural source of bioactive substances, especially of the flavonoid class, with a high topical anti-inflammatory potential and a exploitable antibacterial activity mainly to treat infections caused by *Salmonella* strains, highlighting this vegetal species as a target for the discovery of new therapeutic agents.

Keywords: *Kalanchoe brasiliensis*. Flavonoids. Anti-Bacterial Agents. Anti-inflammatory Agents. *Salmonella*. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

RESUMEN

Kalanchoe brasiliensis Cambess. (Crassulaceae DC.) es una planta nativa de Brasil, conocida popularmente como *Saião* y usada tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas. Los principales metabolitos secundarios presente en esta especie vegetal son las sustancias fenólicas, especialmente los flavonoides. Con base a esta información, el presente estudio tiene como objetivo investigar la composición química e los potenciales antioxidante y antibacteriano *in vitro* y la actividad antiinflamatorio tópica *in vivo* de los extractos hidroetanólicos obtenidos de las hojas de *K. brasiliensis*. Hojas frescas recolectadas en los meses de enero (verano) y septiembre (primavera) fueron extraídas con soluciones hidroetanolicas en las concentraciones de 30% (EHJ30 y EHS30), 50% (EHJ50 y EHS50) y 70% (EHJ70 y EHS70) de etanol en agua con ayuda de un triturador mecanico. Estos extractos fueron químicamente caracterizados por Cromatografía Liquida de Alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de Diodos (CLAE-DAD). Los niveles de fenoles y flavonoides totales fueron determinados por espectrofotometría e la actividad antioxidante fue investigada utilizando los métodos de secuestro de radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), reducción del complejo de fosfomolibdenio e la co-oxidacion del sistema β -caroteno/ácido linoleico. La actividad antibacteriana fue determinada a través de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de microdilución en caldo utilizando ocho cepas bacterianas de referencia ATCC® y diez de rutina. En seguida, se procedio al establecimiento de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) e a la clasificación del efecto antibacteriano bactericida o bacteriostático. La actividad antiinflamatoria tópica fue investigada usando los modelos de edema de oreja inducidos por aceite de croton, fenol e histamina, por medio del análisis hitopatologico y por la determinación de las enzimas mioloperoxidasa (MPO) e N-acetil- β -Dglicosaminidasa (NAG) e de los mediadores inflamatorios óxido nítrico (NO), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los espectros UV obtenidos por CLAE-DAD sugieren la presencia de flavonoides, especialmente de lo flvonol y flavonas. Los teores de fenoles y flavonoides totales variaron de 25.47 a 30.11 mg/g de extracto en equivalente a ácido tánico (EAT) e de 11.84 a 16.95 mg/g de extracto en equivalente de rutina (ER), respectivamente. Los valores de CE₅₀ variaron de 58.08 \pm 15.87 a 257.70 \pm 79.47 μ g/mL y de 8.491 \pm 0.364 a 16.780 \pm 0.239 AAR% para os métodos de secuestro de radical libre DPPH• y de la reducción del complejo de fosfomolibdemio, en ese orden. Los porcentajes de inhibición de la peroxidacion lipídica variaron de 37,51 \pm 0,47 a 44,46 \pm 0,84%. En relacion a la actividad antibacteriana, todos los extratos se mostraron activos frente a las cepas de *Salmonella Choleraesuis* (ATCC® 10708™) y *Salmonella Typhimurium* (ATCC® 13311™), con valores de CIM de 5000 μ g/mL y un efecto bacteriostático. EHJ30, EHJ50, EHJ70 y EHS70 fueron activos frente a la cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), con CIM de 5000 μ g/mL y efecto bacteriostático. EHJ70 e EHS70 inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 6538™), con CIM de 5000 μ g/mL y efecto bacteriostático. Con relación a las cepas de rutina, todos los extractos fueron activos para *Salmonella* Enteritidis 1406591, 1418594 y 1628260 y para *Salmonella* spp. resistente a la fluoroquinolona 1266695 e 1507788, con CIM de 5000 μ g/mL y efecto bacteriostático. EHJ30, EHJ50, EHJ70 e EHS70 inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) 1485279, 1605677, 1830466 y 1664534, con CIM de 5000 μ g/mL y efecto bacteriostático. EHS30 fue activo frente a la MRSA 1605677 y 1830466, con CIM de 5000 μ g/mL y efecto bacteriostático. No fue posible determinar los valores de CBM dentro del gradiente de concentracion utilizado em ninguna de las cepas investigadas. En cuanto a la actividade anti-inflamatória tópica *in vivo*, en el edema de oreja inducido por aceite de Cróton los valores variaron de 74,63 a 85,07% y de 62,03 a 80,34% para la medida y para la masa del edema después de 24 h del desafio, respectivamente. En el edema inducido por el fenol, los porcentajes variaron de 96,46 a 96,73% y de 93,09 a 95,65% para la medida y la masa del edema, en ese orden. En aquel inducido por histamina no fue observado disminuição estadística significativa. La inhibición de la MPO y NAG fue de 55,27 a 81,74% y de 69,04 a 80,82%, respectivamente. Para los mediadores inflamatórios, la inhibicion fue de 52,24 a 67,43%, de 1,68 a 22,78% y de 3,40 a 23,71%, para NO, IL-6 e TNF- α , en ese orden. Los resultados obtenidos sugieren que *K. brasiliensis* es una fuente natural promissora de sustancias bioactivas, especialmente de la clase de los flavonoides, con un potencial antiinflamatorio topico y actividad antibacteriana elevado, digna de ser investigado principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *Salmonella*, destacando esta especie vegetal como un blanco para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos.

Palavras-clave: *Kalanchoe brasiliensis*. Flavonoides. Antibacterianos. Antiinflamatorios. *Salmonella*. *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial da comercialização de plantas medicinais	26
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	31
Figura 3 - Fotografia da exsicata de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ nº 43980) da Universidade Federal de Juiz de Fora	31
Figura 4 - Imagem ilustrativa da estrutura básica de um fenol simples	37
Figura 5 - Imagem ilustrativa das principais estruturas dos compostos fenólicos	38
Figura 6 - Esquema representativo da reação do ácido gálico com molibdênio	39
Figura 7 - Imagem ilustrativa da estrutura básica dos flavonoides	41
Figura 8 - Imagens ilustrativas das estruturas dos hidratos de carbono presentes em flavonoides.....	41
Figura 9 - Resultado dos valores do teor de flavonoides totais de <i>Psidium guajava</i>	42
Figura 10 - Imagem ilustrativa da estrutura química de alguns flavonoides com atividade antioxidante.....	44
Figura 11 - Imagem ilustrativa dos fatores que afetam a disponibilidade dos metabólitos secundários	46
Figura 12 - Esquema representativo da cadeia de estresse oxidativo.....	47
Figura 13 - Esquema representativo da classificação dos antioxidantes.....	48
Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo de produção de espécies reativas de oxigênio e seu mecanismo de eliminação através de antioxidantes enzimáticos.....	49
Figura 15 - Imagem ilustrativa da frequência de utilização de métodos <i>in vitro</i> para determinação da atividade antioxidante.....	50
Figura 16 - Esquema ilustrativo da reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	51
Figura 17 - Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos	53
Figura 18 - Classificação dos métodos para detecção da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	56
Figura 19 - Fotografia de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora	61
Figura 20 - Esquema da diluição seriada realizada em microplaca para determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)	65
Figura 21 - Imagem ilustrativa da organização das microplacas utilizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016	72
Figura 22 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparo da diluição seriada realizada em microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	73
Figura 23 - Esquema ilustrativo do preparo dos controles utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo realizado em microplaca.....	74
Figura 24 - Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima e para classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático	75
Figura 25 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 30% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ30) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm	83
Figura 26 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 50% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ50) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm	84

Figura 27 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 70% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ70) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm	85
Figura 28 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 30% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ30) obtido por CLAE-DAD a 254 nm	86
Figura 29 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 50% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ50) obtido por CLAE-DAD a 254 nm	86
Figura 30 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 70% janeiro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHJ70) obtido por CLAE-DAD a 254 nm	87
Figura 31 - Espectros de absorção na região do UV dos picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30% janeiro (EHJ30), 50% janeiro (EHJ50) e 70% janeiro (EHJ70) de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> obtidos por CLAE-DAD a 254 nm.....	88
Figura 32 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 30% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS30) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm	89
Figura 33 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 50% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS50) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm	90
Figura 34 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 70% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS70) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm	91
Figura 35 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 30% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS30) obtido por CLAE-DAD a 254 nm.....	92
Figura 36 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 50% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS50) obtido por CLAE-DAD a 254 nm.....	93
Figura 37 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 70% setembro de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (EHS70) obtido por CLAE-DAD a 254 nm.....	93
Figura 38 - Espectros de absorção na região do UV dos picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30% setembro (EHS30), 50% setembro (EHS50) e 70% setembro (EHS70) de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> obtidos por CLAE-DAD a 254 nm.....	95
Figura 39 - Imagem gráfica da curva de calibração da solução padrão de ácido tânico	96
Figura 40 - Imagem gráfica da curva de calibração da solução padrão de rutina	97
Figura 41 - Porcentagens de inibição (%I) dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016, ácido ascórbico e quercetina.....	99
Figura 42 - Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico obtido com os extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 e com quercetina	101
Figura 43 - Análise histológica do efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das substâncias identificadas em <i>Kalanchoe brasiliensis</i> descritas na literatura.....	34
Tabela 2 - Classes de flavonoides e suas respectivas bandas A e B de absorção e comprimentos de onda.....	43
Tabela 3 - Esquema do preparo de diluições empregadas para a determinação do teor de flavonoides totais.....	64
Tabela 4 - Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos de organismos não fastidiosos.....	70
Tabela 5 - Descrição da composição das soluções-estoque empregadas para investigação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 e de ampicilina e cloranfenicol por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo.....	71
Tabela 6 - Resultados das massas e dos rendimentos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016.....	82
Tabela 7 - Valores dos tempos de retenção dos principais picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 e obtidos por CLAE-DAD a 254 nm.....	94
Tabela 8 - Resultados dos teores de fenóis totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em equivalente a ácido tânico (EAT).....	97
Tabela 9 - Resultados dos teores de flavonoides totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em equivalente a rutina (ER).....	98
Tabela 10 - Resultados da porcentagem de inibição (%I) e da CE ₅₀ dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 obtidos pelo método do sequestro do radical DPPH•.....	99
Tabela 11 - Resultados dos valores da Atividade Antioxidante Relativa (AAR%) dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 obtidos pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio.....	100
Tabela 12 - Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	101
Tabela 13 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 e dos antibióticos-padrão frente às cepas de referência testadas.....	103
Tabela 14 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro e setembro de 2016 e dos antibióticos-padrão frente às cepas de rotina testadas.....	104
Tabela 15 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton após 6 e 24 horas de tratamento.....	106

Tabela 16 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	108
Tabela 17 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por histamina.....	110
Tabela 18 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).....	114
Tabela 19 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> coletadas em janeiro de 2016 sobre a produção de óxido nítrico (NO)	115
Tabela 20 - Efeito dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> sobre produção de citocinas	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AH	Antioxidante
AMH	Agar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CAM	Metabolismo do Ácido Crassuláceo
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CESJ	Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CHL	Cloranfenicol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CO ₂	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAT	Equivalente Ácido Tânico
EJH30	Extrato Hidroetanólico 30% janeiro
EJH50	Extrato Hidroetanólico 50% janeiro
EJH70	Extrato Hidroetanólico 70% janeiro
EHS30	Extrato Hidroetanólico 30% setembro
EHS50	Extrato Hidroetanólico 50% setembro
EHS70	Extrato Hidroetanólico 70% setembro

E.P.M	Erro Padrão Médio
ER	Equivalente Rutina
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ESI-MS	do inglês <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FR•	Radical Livre
HNO ₂	Ácido Nitroso
IL	Interleucina
iNOS	Inibidor da Síntese de Óxido Nítrico
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LOO•	Radical Lipídico Peroxilo
LTs	Leucotrienos
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NO	Óxido Nítrico
NO•	Radical Óxido Nítrico
N ₂ O ₃	Óxido Nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
O ₂ •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinítrico
ORAC	do inglês <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAL	Fenilalanina Amônio Liase
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteínaquinase C
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RO•	Radical Alcoxila
ROO•	Radical Peroxila
SEs	Solução-Estoque
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPA	12-O-tetra-canoilforbol-13-acetato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
h-VISA	do inglês <i>heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i>
VISA	do inglês <i>Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRSA	do inglês <i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
AA	Ácido Araquidônico

LISTA DE SÍMBOLOS

A_{ar}	Absorbância antes da reação
A_{br}	Absorbância após a reação
Kg	Quilograma
mM	Milimol
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	Gramas
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 PLANTAS MEDICINAIS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS OU PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS	25
2.2 A FAMÍLIA CRASSULACEAE DC.....	28
2.2.1 O gênero <i>Kalanchoe</i> Adans.....	29
2.2.2 A espécie <i>Kalanchoe brasiliensis</i> Cambess	30
2.3 METABOLISMO VEGETAL: DERIVADOS FENÓLICOS	37
2.3.1 Flavonoides: aspectos gerais	40
2.4 METABOLISMO VEGETAL: FATORES QUE PODEM INTERFERIR NO TEOR DOS DERIVADOS FENÓLICOS	45
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	46
2.5.1 Aspectos gerais da atividade antioxidante.....	46
2.5.1.1 Estresse oxidativo	46
2.5.1.2 Determinação da atividade antioxidante.....	49
2.5.2 Aspectos gerais da atividade antibacteriana	53
2.5.2.1 Importância de novos agentes antibacterianos	53
2.5.2.2 Métodos de avaliação da atividade antibacteriana	55
2.5.3 Aspectos gerais da atividade anti-inflamatória.....	56
3. OBJETIVOS.....	59
3.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	60
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe</i> <i>brasiliensis</i>	61
4.3 INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i> OBTIDOS EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE- DAD).....	62
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	62
4.5 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS	63
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	64
4.6.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH [•])	64
4.6.2 Método de redução da complexação do fosfomolibdênio	66
4.6.3 Método de cooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	67
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	68
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	71
4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	75
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA <i>in vivo</i>	75
4.8.1 Animais.....	76
4.8.2 Método de edema de orelha induzido por óleo de Cróton.....	76
4.8.3 Método do edema de orelha induzido por fenol.....	77

4.8.4 Método do edema de orelha induzido por histamina.....	77
4.8.5 Avaliação do edema de orelha.....	78
4.8.6 Análise histopatológica	78
4.8.7 Determinação da mieloperoxidase (MPO)	78
4.8.8 Determinação da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG)	79
4.8.9 Determinação da produção do óxido nítrico	80
4.8.10 Determinação da produção de citocinas	80
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
5. RESULTADOS	82
5.1 MASSAS E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i> EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA.....	82
5.2 INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i> OBTIDOS EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE- DAD).....	82
5.2.1 Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> obtidos em janeiro	83
5.2.2 Perfil cromatográficos dos extratos hidroetanólicos de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> obtidos em setembro.....	88
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	96
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	97
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE antioxidante <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	98
5.5.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH \cdot).....	98
5.5.2 Método de redução da complexação do fosfomolibdênio	100
5.5.3 Método da cooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	100
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Kalanchoe brasiliensis</i> OBTIDOS EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA.....	102
5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e do efeito antibacteriano bacteriostático ou bactericida.....	102
5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA	105
5.7.1 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton.....	105
5.7.2 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 sobre o edema de orelha induzido por fenol	107
5.7.3 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 sobre o edema de orelha induzido por histamina	109
5.7.4 Análise histopatológica	111
5.7.5 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> sobre as enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	113
5.7.6 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> sobre a produção de óxido nítrico (NO)	115
5.7.7 Efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 das folhas de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> sobre a produção de citocinas	115
6. DISCUSSÃO.....	117
7. CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS	130

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, Protocolo nº 005/2016.....	146
ANEXO B - <i>Conference Paper</i> intitulada "Chemical characterization and <i>in vitro</i> antibacterial activity of <i>Kalanchoe brasiliensis</i> Cambess. (Crassulaceae)", publicada na Planta Medica , v. 81, n. S01, p. S366-S367, 2016. http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1596480	147
ANEXO C - <i>Conference Paper</i> intitulada " <i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb. (Crassulaceae): an interesting source of bioactive substances to treat infectious diseases caused by <i>Salmonella</i> strains", publicada na PharmacologyOnLine , v. 1, Supplementary Issues, p. 241-241, 2016.....	149
ANEXO D - Resumo intitulado " <i>In vitro</i> antibacterial activity of <i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb. (Crassulaceae) against <i>Staphylococcus aureus</i> " apresentado e publicado nos Anais do VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, SC, Brasil.....	151

1. INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos da humanidade, os produtos naturais vêm sendo usados para curar doenças, de tosses e resfriados até infecções parasitárias e processos inflamatórios diversos, conforme registros realizados por civilizações dos antigos chineses, indianos e norte-africanos (Matéria Médica Chinesa; Sistema Ayurvédico) (CRAGG; NEWMAN, 2013; GURIB-FAKIM; 2006).

No mundo globalizado do século XXI, um longo caminho foi percorrido para se chegar até a atual definição de Medicina Tradicional que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)

"é a soma total do conhecimento, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizada na manutenção da saúde, assim como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais" (WHO, 2013).

Sob esta ótica, o uso das plantas medicinais foi disseminado no Brasil, principalmente pela cultura indígena, e a ampla biodiversidade natural brasileira, com mais de 46.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta) distribuída em seus seis biomas (amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal), contribuiu substancialmente para o legado do uso da medicina tradicional no país (SOUSA et al., 2008; <http://www.sibbr.gov.br/areas/>, acessado em 18 setembro de 2017). Esta conjunção estabeleceu um cenário interessante para o desenvolvimento de desenhos de estudos que visam à descoberta de novos fármacos a partir de espécies vegetais nativas (PIZZIOLO et al., 2011).

Além disto, no Brasil, os produtos naturais com atividade terapêutica são categorizados em duas classes, sendo denominados medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

"fitoterápicos são medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade" (BRASIL, 2014).

Os produtos tradicionais fitoterápicos, por sua vez, são considerados como aqueles

"obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados

de uso seguro e efetivo publicado na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização" (BRASIL, 2014).

De acordo com a OMS, a medicina tradicional é encontrada em quase todos os países do mundo e a demanda por seus serviços está em franca ascensão (WHO, 2013). Embora os medicamentos à base de plantas apresentem menos efeitos colaterais, a ideia de que são seguros e livres de reação indesejada é falsa. As plantas contêm centenas de constituintes e alguns deles podem ser tóxicos, como por exemplo, os alcalóides de pirrolizidina (CALIXTO, 2000). Este fato conduz à importância da qualidade dos medicamentos à base de material vegetal, a qual tem um impacto direto sobre a segurança e eficácia desses produtos na saúde humana (WHO, 2013).

Neste sentido, a padronização do extrato é necessária devido às variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como às proporções relativas de metabólitos secundários nas plantas, que ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, afetando a eficiência das substâncias ativas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A época em que o material vegetal é coletado é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante; portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Com base nas considerações apresentadas acima, bem como em uma das ações da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que se propõe a "desenvolver estratégias de comunicação, formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos" (BRASIL, 2009), o presente estudo optou pela investigação da espécie vegetal *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae DC) em duas épocas do ano: janeiro (verão) e setembro (primavera).

Kalanchoe brasiliensis, popularmente conhecida como saião, orelha de macaco, folha grossa ou folha da sorte, é uma planta nativa do Brasil, distribuída da Bahia a São Paulo, e tradicionalmente usada no tratamento de lesões, abscessos,

processos inflamatórios e enfartamento ganglionar (LUCAS; MACHADO, 1946; ROSSI-BERGMANN et al., 1997).

Com base no uso tradicional que evidencia o potencial terapêutico desta planta medicinal, o presente estudo teve como objetivo investigar os potenciais antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), teste de redução da complexação do fosfomolibdênio e ensaio de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, e antibacteriano por meio das determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático *in vitro* dos extratos obtidos das folhas de *K. brasiliensis* coletadas em janeiro (verão) e setembro (primavera) e a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* por meio do edema de orelha induzido pelos agentes flogísticos óleo de Cróton, histamina e fenol e pelos extratos hidroetanólicos 50% e 70% obtidos das folhas dessa espécie vegetal coletadas em janeiro, visando corroborar seu uso tradicional bem como oferecer subsídio científico para novas opções terapêuticas seguras e eficazes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS OU PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS

As plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial como uma terapia alternativa para tratar muitas doenças, sendo uma prática comum há milhares de anos. No entanto, a busca dos constituintes ativos presentes nestas espécies vegetais começou somente a partir do século XIX, levando à concepção do primeiro fármaco com as características que hoje conhecemos (isolamento da morfina a partir da papoula por Friedrich Serturmer em 1806) (DUTRA et al., 2016).

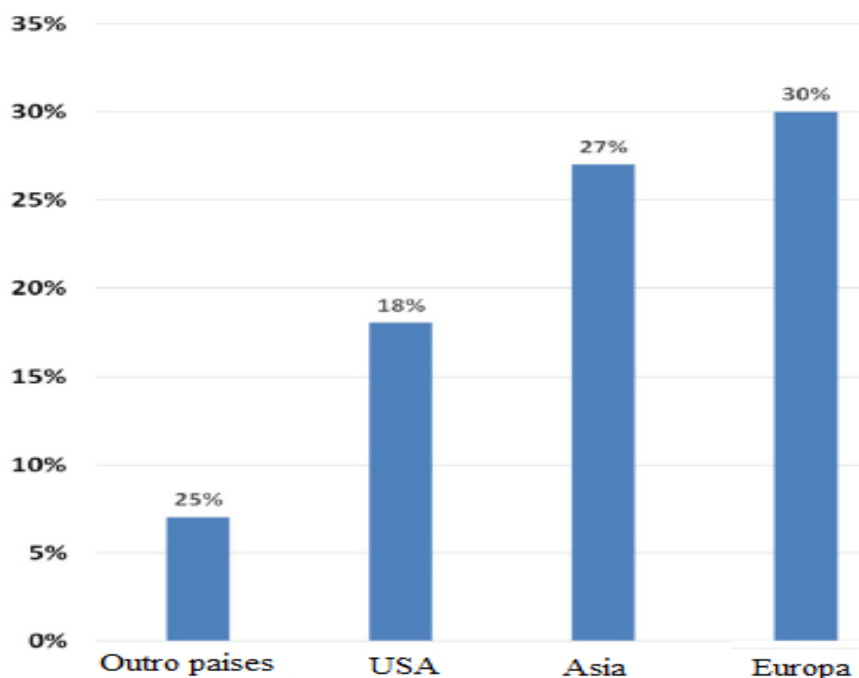
Segundo Foglio e colaboradores (2006), as plantas medicinais podem ser consideradas como

"quaisquer espécies vegetais que, em um ou mais dos seus órgãos, contêm substâncias que podem ser administradas sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica" (FOGLIO et al., 2006).

As plantas medicinais podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se por aquelas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, das empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese (FOGLIO et al., 2006).

O interesse em medicamentos derivados de espécies vegetais aumentou significativamente em todo o mundo, especialmente nos países desenvolvidos tais como alguns países da Europa e Estados Unidos, e estima-se que o mercado mundial global para essa classe de medicamentos tenha alcançado, em 2014, cerca de 28 bilhões de dólares americanos (DUTRA et al., 2016). Apesar da abundante biodiversidade brasileira e do grande interesse da população pelo uso da medicina tradicional, o mercado nacional de fitoterápicos ainda é muito modesto, representando cerca de 261 milhões de dólares americanos (DUTRA et al., 2016).

Figura 1 - Distribuição mundial da comercialização de plantas medicinais



Fonte: ADAPTADO DE DUTRA et al., 2016

Como exemplos de plantas utilizadas na medicina tradicional estão as ervas do ginseng de *Panax* (ginseng) usadas como tônico, *Tanacetum parthenium* Sch. Bip (*feverfew*) utilizado para tratar enxaqueca, *Allium sativum* L. (alho) empregado para diminuir o colesterol de baixa densidade e para tratar alguns distúrbios cardiovasculares, *Matricaria chamomilla* L. (camomila) recomendado como carminativo, anti-inflamatório e antiespasmódico, e *Silybium marianum* (L.) Gaertn usado para reparar a função hepática, incluindo quadros de cirrose (DUTRA et al., 2016).

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda contribuem substancialmente para os cuidados à saúde (CALIXTO, 2000), uma vez que os produtos naturais foram as principais fontes de matérias-primas para o desenvolvimento farmacêutico ao longo do século passado, devido à sua composição química (MISHRA; TIWARI, 2011).

De acordo com a legislação sanitária brasileira e como descrito em detalhes nas páginas 25 e 26, o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais é conhecido como fitoterápico (BRASIL, 2004) e, geralmente, seus princípios ativos, responsáveis por sua ação farmacológica, são desconhecidos (CALIXTO, 2000). Na maioria das vezes, as atividades farmacológicas destes

fitoterápicos são devido a uma gama de constituintes que atuam simultaneamente e de forma sinérgica (ANSARI; ISLAM; SAMEEM, 2012).

Uma característica básica dos agentes fitoterápicos é o fato de que normalmente essas substâncias não possuem uma ação farmacológica imediata ou forte. Por esta razão, estes medicamentos não são utilizados para tratamento de emergência, sendo frequentemente empregados, porém, na terapêutica de doenças crônicas (CALIXTO, 2000). Ainda, algumas vantagens que justificam o uso dos fitoterápicos podem ser salientadas, tais como os efeitos sinérgicos entre as substâncias presentes no extrato, associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, menores riscos de efeitos colaterais e menores custos de pesquisa (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a ANVISA, que tem como função proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (BRASIL, 1999). A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade, identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. Há, ainda, as Resoluções Específicas (RE) como a RE 88/2004, que contempla a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008).

Finalmente, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde divulgou uma lista contendo os nomes de 71 plantas com potencial terapêutico, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), cujo objetivo é

"orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença" (BRASIL, 2009).

Em 06 de março de 2009, a Agência de Saúde divulgou que "a RENISUS deverá ser revisada e atualizada periodicamente, a critério do Ministério da Saúde" (BRASIL, 2009).

Com base nas considerações apresentadas, para seleção das espécies vegetais a serem estudadas, três critérios podem ser adotados, a saber: (i) escolha da planta de forma aleatória, desprovida de qualquer critério, desde que haja disponibilidade da espécie vegetal (abordagem randômica); (ii) escolha da planta correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família (abordagem quimiotaxonômica ou filogenética); e (iii) escolha da espécie vegetal baseada nas informações do uso e evidências terapêuticas fornecidas pela população ou por um determinado grupo étnico (abordagem etnofarmacológica) (MACIEL et al., 2002).

2.2 A FAMÍLIA CRASSULACEAE DC.

De acordo com os dados disponíveis no sítio eletrônico *The Plant List - a working list of all plant species*, a família Crassulaceae DC. é o principal grupo de Angiospermas (plantas floridas) composto por 50 gêneros e 1.482 espécies aceitas (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Crassulaceae/>, acessado em 29 de fevereiro de 2016). As espécies vegetais desta família estão distribuídas principalmente em *habitats* semiáridos, sendo observadas nos países das Américas do Norte e Sul, incluindo o Brasil, Macaronésia [composta por três arquipélagos, Açores e Madeira (ambos pertencentes a Portugal) e ilhas Canárias (Espanha) (UE, 2010)], África do Sul, Madagascar, entre outros (MORT et al., 2001).

A Crassulaceae está dividida em seis subfamílias distribuídas em duas linhagens, *Crassula* L. (subdividida nas subfamílias Crassulaceae, Cotyledonoideae e Kalanchoideae) e *Sedum* L. (Echeverioideae, Sedoideae e Sempervivoideae) (MORT et al., 2001).

As espécies vegetais pertencentes a esta família são herbáceas ou sublenhosas, pouco ramificadas, que atingem até um (1) metro de altura, especialmente durante a floração. Têm folhas suculentas, ovaladas ou obovadas (quando a parte mais estreita da lâmina foliar se encontra perto do pecíolo ou da bainha), de margens onduladas à subcrenadas. Os membros de Crassulaceae não são considerados plantas de cultivo importantes, sendo, porém, utilizados na horticultura. Além disso, muitas espécies têm uma aparência atraente incomum, sendo bastante resistentes e requisitando, dessa forma, apenas cuidados mínimos de manutenção. É notável a estrutura xeromórfica (estrutura vegetal para adaptação a climas semiáridos

a desérticos), particularmente a ocorrência de adaptações para armazenamento de água na folha e no caule (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014).

2.2.1 O gênero *Kalanchoe* Adans.

O gênero *Kalanchoe* Adans. compreende de 150 a 200 espécies nativas de áreas tropicais, África e Brasil. No passado, este gênero foi inicialmente dividido em três, *Kalanchoe*, *Bryophyllum* e *Kitchingia*. Porém, a maioria dos botânicos resgatou *Kalanchoe* como consensual (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014). Geralmente, plantas deste gênero são robustas, com folhas opostas e carnudas e flores amarelas, roxas ou vermelhas (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014; SMITH, 2004). Além disso, possuem um importante papel na investigação da bioquímica e da ecofisiologia e dos aspectos filogenéticos ligados ao metabolismo do ácido crassuláceo (GEHRIG et al., 2001), que consiste em assimilar o dióxido de carbono (CO₂) atmosférico em ácidos de quatro carbonos, predominantemente durante a noite e, subsequentemente, convertê-los em carboidratos durante o dia seguinte, através do ciclo de Calvin (GEYDAN; MELGAREJO, 2005).

Algumas das espécies mais importantes são *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., *Kalanchoe brasiliensis* Cambess., *Kalanchoe crenata* Andrew, *Kalanchoe gracilis* L., *Kalanchoe marmorata* Baker, *Kalanchoe pinnata* Lam., *Kalanchoe spathulata* DC. e *Kalanchoe streptantha* Baker (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014).

Sob o ponto de vista do uso tradicional, em países como Índia, Sri Lanka, Nigéria e Taiwan, espécies deste gênero são utilizadas no tratamento de otite, disenteria, abscessos, doenças de pele, febre, tosse, picadas de insetos, artrite e úlceras gástricas (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014; MOURÃO et al., 1999). No Brasil, o suco de *Kalanchoe* é utilizado localmente para o tratamento de feridas e furúnculos, doença periodontal e contusões, sendo que as espécies mais utilizadas para fins medicinais são *K. brasiliensis* e *K. pinnata* (LORENZI; MATOS, 2000).

Sob a ótica da Farmacologia, diversas atividades biológicas são atribuídas às espécies de *Kalanchoe*, tais como anticancerígena (HSIEH et al., 2015), anti-hipertensiva (FRIMPONG-MANSO et al., 2015), inibidora da ativação de linfócitos (MORAES et al., 1994), imunossupressora (PAIVA et al., 2008b), inibidora do desenvolvimento das células B (PAIVA et al., 2008a), leishmanicida (SILVA; COSTA;

MENDONÇA, 1995), hepatoprotetora (YADAV, DIXIT, 2003), antibacteriana (SARKAR et al., 2015) e anti-inflamatória (COSTA et al., 2006; MOURÃO et al., 1999).

Em investigação realizada por Nguelefack e colaboradores (2006), o efeito do extrato de cloreto de metileno:metanol (1:1) das folhas de *K. crenata* foi avaliado sobre convulsões induzidas por pentilenotetrazol, sulfato de estricnina e tiossemicarbazida. Este extrato aumentou significativamente o período de latência das convulsões induzidas por pentilenotetrazol e reduziu, de forma também significativa, a duração dos ataques induzidos pelos três agentes convulsivantes (NGUELEFACK et al., 2006).

Em 2007, Harlalka, Patil e Patil reportaram, em estudo *in vivo* utilizando ratos *Wistar*, que o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* possuía atividade antioxidante significativa, bem como um efeito neuroprotetor em caso de nefrotoxicidade induzida por gentamicina (HARLALKA; PATIL; PATIL, 2007).

A partir de diferentes espécies de *Kalanchoe*, diversos metabólitos e substâncias pertencentes às classes químicas distintas tais como flavonoides glicosilados, antocianinas, cumarinas, bufadienolídeos, triterpenoides, fenantrenos, esteróis, ácidos graxos e substâncias puras como o kalanchosídeo dimalato, têm sido isolados, purificados e identificados (MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014).

2.2.2 A espécie *Kalanchoe brasiliensis* Cambess.

Como as demais espécies pertencentes ao gênero *Kalanchoe*, *K. brasiliensis*, cuja sinonímia científica é *Kalanchoe laciniata* (L.) DC. (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-8902741>, acessado em 01 de março de 2016), é uma planta amplamente distribuída em Madagascar e Brasil (Figura 2), onde é observada desde a Bahia até São Paulo (MOURÃO et al., 1999), sendo popularmente conhecida como coirama branca, saião, folha da costa, orelha de macaco, folha grossa ou folha da sorte (LORENZI; MATOS, 2000; MOURÃO et al., 1999). Apesar desta sinonímia científica, *K. laciniata* é a espécie-tipo do gênero *Kalanchoe*, sendo diferenciada nas investigações envolvendo *K. brasiliensis* (*The Plant List*: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-8902741>, acessado em 01 de março de 2016). Este fato pode ser constatado ao se utilizar *K. laciniata* como palavra-chave no *Pubmed*, importante plataforma de busca científica amplamente empregada na área de

saúde, e cujo resultado obtido foi "no items found" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kalanchoe+laciniata>, acessado em 02 de março de 2016). Assim, no presente estudo foi utilizada a denominação *K. brasiliensis* para se referir à espécie vegetal objeto de estudo, mas com o cuidado de se atualizar a literatura empregando-se os dois nomes científicos como palavra-chave sempre que necessário.

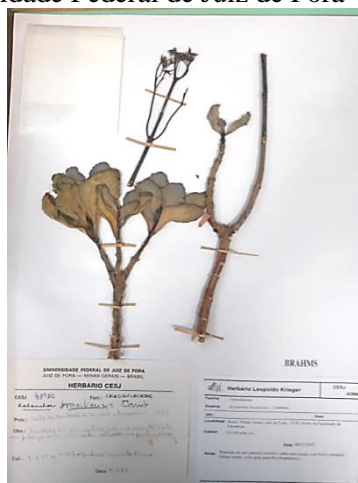
Figura 2 - Distribuição geográfica de *Kalanchoe brasiliensis*



As zonas de cor verde no mapa representam a distribuição geográfica de *Kalanchoe brasiliensis*. Fonte: (<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=8902740>, acessado em 01 de março de 2016)

K. brasiliensis é uma planta herbácea, pouco ramificada e que atinge até um (1) metro de altura especialmente durante a floração, possui folhas suculentas, ovaladas e de margens onduladas à subcrenadas e flores de tom amarelo-alaranjado dispostas em grandes panículas, como apresenta a Figura 3 (LORENZI; MATOS, 2000).

Figura 3 - Fotografia da exsicata de *Kalanchoe brasiliensis* depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ nº 43980) da Universidade Federal de Juiz de Fora



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Na medicina tradicional, as folhas desta planta medicinal são utilizadas para o tratamento de lesões, abscessos, processos inflamatórios e gânglios dilatados (LUCAS; MACHADO, 1946; ROSSI-BERGMANN et al., 1997).

Adicionalmente, entre os estudos encontrados na literatura que corroboram a sustentação do uso popular-terapêutico de *K. brasiliensis* são encontradas as atividades antiúlcera (MEDEIROS; WANDERLEY, 2009), inibidora da tiroide peroxidase (FERREIRA; ROSENTHAL; CARVALHO, 2000), inibidora da acetilcolinesterase (FEITOSA et al., 2011), imunomodulatória (COSTA et al., 1994; IBRAHIM et al., 2002), larvicida (TREVISAN et al., 2006), antibacteriana (SILVA et al., 2009) e anti-inflamatória (COSTA et al., 2006; FONSECA et al., 2004; IBRAHIM et al., 2002; MOURÃO et al., 1999).

O potencial anti-inflamatório desta espécie vegetal foi descrito por Mourão e colaboradores (1999), ao investigarem o suco das folhas antes e durante o período de floração por meio do modelo de inflamação por edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*, cujo resultado demonstrou um significativo efeito farmacológico desse suco antes do período de floração e uma ação pró-inflamatória quando a planta apresentava flor (MOURÃO et al., 1999).

Quanto ao potencial antibacteriano, ao se efetuar uma busca no *Pubmed* utilizando como palavras-chave *antibacterial activity* e *Kalanchoe brasiliensis*, o resultado obtido não revelou nenhuma publicação científica com esse foco (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibacterial+activity+of+Kalanchoe+brasiliensis>, acessado em 01 de março de 2016). Porém, esse mesmo exercício localizou dois artigos quando usada a plataforma *Google* de busca, a saber: Silva e colaboradores (2009) e Iqbal e colaboradores (2016).

Silva e colaboradores (2009) investigaram a propriedade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico (etanol 90%) e do óleo essencial das folhas e da alcoolatura (etanol 95%) do caule de *K. brasiliensis* pela determinação da CIM por meio do método de difusão em ágar e cinética bactericida frente cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas e fungos leveduriformes do gênero *Candida*. Estes autores descreveram que somente o óleo essencial revelou atividade e que nas concentrações de 4% e 8% mostrou-se ativo frente a todas as cepas de *Staphylococcus aureus* testadas, inclusive *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) (SILVA et al., 2009).

Em 2016, Iqbal e colaboradores reportaram as atividades antioxidante, antibacteriana e moduladora intestinal de *K. laciniata*, sinônimo de *K. brasiliensis* como descrito na pág. 33, e descreveram o efeito antibacteriano do extrato metanólico 70% obtido a partir das folhas secas dessa espécie vegetal. Segundo estes autores, esse extrato foi ativo frente à *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, com valores de CIM e de Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 5 e 2,5 mg/mL e de 10 e 5 mg/mL, respectivamente.

Sob o ponto de vista químico, Costa e colaboradores (1994) isolaram e identificaram sete derivados ramnosídeos da patuletina, determinando as estruturas por espectrometria de massa $^1\text{H}-^1\text{H}$ e $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY, descrevendo três novas patuletinas acetil di-O ramnosídeo, kalambrosídeos A, B, e C, no suco de *K. brasiliensis* (COSTA et al., 1994). Cruz e colaboradores (2012), por sua vez, estudaram durante seis meses o efeito da distribuição de antocianinas sob a influência de quatro níveis de luminosidade. A quantificação dessas substâncias em pecíolos mostrou que as amostras com uma intensidade de 70% de luz possuíam níveis de antocianina maiores do que aquelas com 25%, mas nas folhas não houve resultados significativos (CRUZ et al, 2012).

Na Tabela 1 estão apresentadas as substâncias isoladas a partir de diferentes extratos obtidos de *K. brasiliensis* descritas na literatura. Pela análise desta Tabela, pode ser observado o predomínio de flavonoides, especialmente os compostos glicosilados da patuletina.

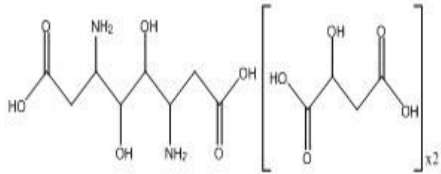
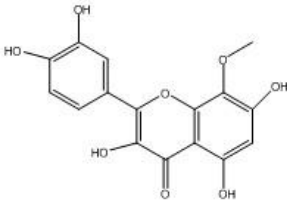
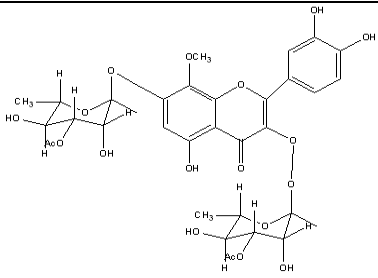
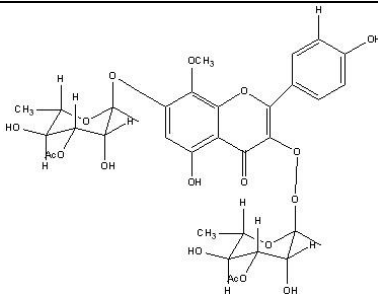
Tabela 1 - Dados das substâncias identificadas em *Kalanchoe brasiliensis* descritas na literatura

Substância	Estrutura	Peso molecular (g/mol)	Parte da Planta	Referência
Kalambrosídeo A Patuletina 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O- α -L-ramnopiranosídeo		$C_{32}H_{36}O_{18}$ 708,6174	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
3-O-(4''-O-acetil- α -L-ramnopiranosil)-7-O-(3'''-O-acetil- α -L-ramnopiranosídeo)		$C_{32}H_{36}O_{18}$ 708,6174	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
Kalambrosídeo B		$C_{30}H_{34}O_{17}$ 666,5808	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
Kalambrosídeo C		$C_{30}H_{34}O_{17}$ 666,5808	Caules e folhas	COSTA et al., 1994

 Continuação da Tabela 1

Substância	Estrutura	Peso molecular (g/mol)	Parte da Planta	Referência
Patuletina 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-(3''-O-acetil- α -L-ramnopiranosídeo)		C ₃₀ H ₃₄ O ₁₇ 666,5808	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
Patuletina 3-O-ramnosídeo		C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ 478,4029	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
Patuletina 3,7-di-O-ramnosídeo		C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆ 624,5441	Caules e folhas	COSTA et al., 1994
Quercetina Quercetina 3-ramnosídeo		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ 448,3769	Partes aéreas	MILAD; EL-AHMADY; SINGAB, 2014

Continuação da Tabela 1

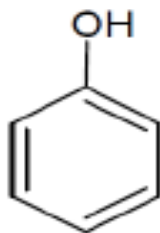
Substância	Estrutura	Peso molecular (g/mol)	Parte da Planta	Referência
Complexo kalanchosina e ácido málico		Não encontrado	Partes aéreas	PAIVA et al., 2008a
8-metoxiquercetina 3,3',4',5,7-Pentaidroxi-8-metoxiflavona		$C_{16}H_{12}O_8$ 332,2616	Folhas	TREVISAN et al., 2006
3,7-di-O- α -L-raminopiranosil 8-metoxiquercetina		$C_{35}H_{42}O_{19}$ 766,23	Folhas	TREVISAN et al., 2006
3,7-di-O-raminosil 8-metoxicanferol		$C_{35}H_{42}O_{18}$ 750,24	Folhas	TREVISAN et al., 2006

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

2.3 METABOLISMO VEGETAL: COMPOSTOS FENÓLICOS

São conhecidas aproximadamente 8.000 diferentes estruturas de substâncias fenólicas encontradas nas plantas que, quimicamente, compartilham uma característica estrutural comum, a incidência no anel aromático de pelo menos uma hidroxila substituinte (Figura 4) (DZIALO et al., 2016; STALIKAS, 2007). Conforme mostra a Figura 4, neste ponto, geralmente o hidrogênio é substituído por um resíduo mais ativo, tais como hidroxilo, metilo ou acetilo. Deste modo, as propriedades biológicas variáveis dos compostos fenólicos resultam a partir do padrão e grau dos substitutos (DZIALO et al., 2016).

Figura 4 - Imagem ilustrativa da estrutura básica de um fenol simples



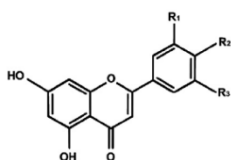
Fonte: ADAPTADO DE BRAVO, 1998

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois principais grupos, flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides são divididos em seis subclasses principais, a saber: flavonois, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, isoflavonas e antocianidinas (STALIKAS, 2007). A segunda classe de compostos fenólicos, os não flavonoides, correspondem aos ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos, taninos e lignina (DZIALO et al., 2016). Na Figura 5, estão ilustradas as estruturas básicas dos compostos fenólicos.

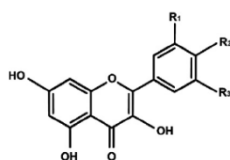
Figura 5 - Imagem ilustrativa das principais estruturas dos compostos fenólicos

Compostos fenólicos flavonoides

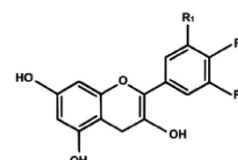
Flavonol



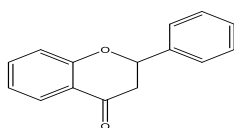
Flavona



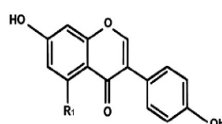
Flavan-3-ol



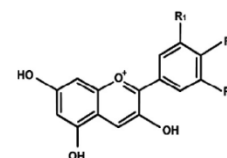
Flavanona



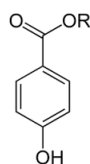
Isoflavona



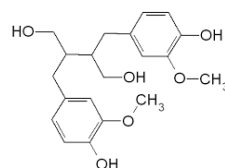
Antocianidina

**Compostos fenólicos não flavonoides**

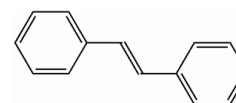
Ácido fenólico



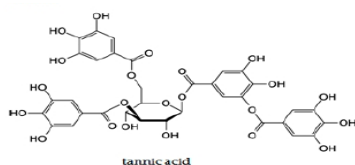
Lignano



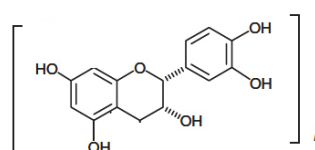
Estilbeno



Tanino



Lignina



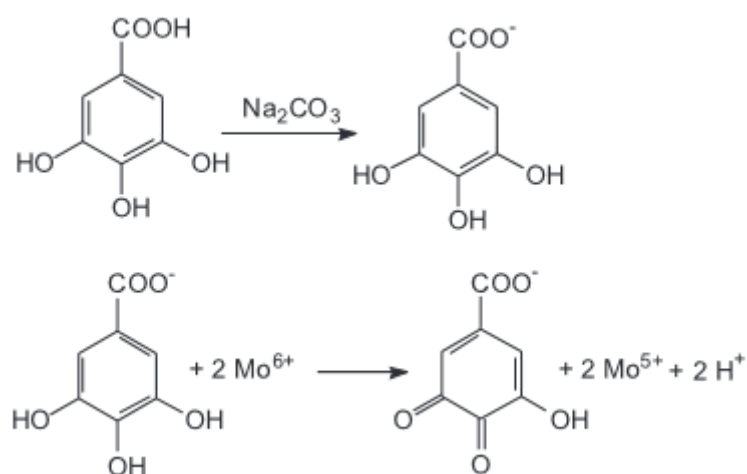
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Os ácidos fenólicos mais comuns nos tecidos das plantas são os ácidos hidroxicinâmicos (como por exemplo, ácidos cafeico, clorogênico, *o*-, *m*- e *p*-cumárico, ferúlico e sinapínico) e hidroxibenzoicos (ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico e vanílico), que ocorrem na forma associada como ésteres ou glicosídeos. Os taninos podem ocorrer como hidrolisáveis (formados na via metabólica dos ácidos fenólicos com açúcares) ou condensados. Como exemplo de lignanas, que

são compostos dímeros fenilpropanoides, estão as secoisolariciresinol, lariciresinol, pinoresinol e matairesinol (DZIALO et al., 2016).

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais têm sido desenvolvidos métodos espectrofotométricos diversos. Estes ensaios se baseiam em diferentes princípios e são utilizados para determinar vários grupos estruturais presentes nestes compostos (NACZK; SHAHIDI, 2004), sendo os métodos de Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis os mais empregados. O reagente Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ ; porém, na presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul (Figura 6) (SOUSA et al., 2007). O reagente Folin-Denis, por sua vez, é uma solução constituída por uma mistura de tungstato de sódio, ácido fosfomolibdico e ácido fosfórico (FOLIN; DENIS, 2012).

Figura 6 - Esquema representativo da reação do ácido gálico com molibdênio



Fonte: OLIVEIRA et al., 2009

Na planta, os compostos fenólicos podem atuar como fitoalexinas, atraentes para polinizadores, contribuintes para a pigmentação da planta, antioxidantes e agentes protetores contra a luz ultravioleta (UV), entre outros. Em alimentos, podem contribuir para a amargura, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Na saúde, vários benefícios têm sido atribuídos a estes compostos e suas importantes atividades biológicas e farmacológicas implicam em um objeto atual de pesquisa, especialmente por suas propriedades anti-inflamatória

(DZIALO et al., 2016), antioxidante (ABE et al., 2007; DZIALO et al., 2016; PERRON; BRUMAGHIM, 2009), antibacteriana (DZIALO et al., 2016), antienvelhecimento (DZIALO et al., 2016), e no tratamento de doenças de pele (DZIALO et al., 2016) e de desordens neurodegenerativas (JONES et al., 2012).

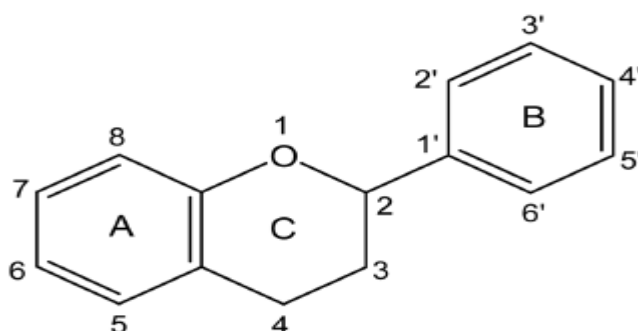
Sobre o potencial antioxidante, os compostos fenólicos são amplamente estudados, sendo associado à estrutura anelar da molécula, às duplas ligações conjugadas e à presença de grupos funcionais no anel que atuam: a) inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que leva à extinção de oxigênio *singlete*; b) produzindo quelação dos íons metálicos, que são os catalisadores de reações que conduzem à formação de ERO; e c) interrompendo a cascata de reações de radical livre na peroxidação lipídica (DZIALO et al., 2016; PERRON; BRUMAGHIM, 2009).

2.3.1 Flavonoides: aspectos gerais

Os flavonoides são um dos maiores grupos de metabólitos secundários presentes nas plantas e desempenham um importante papel como substâncias de defesa e sinalização na reprodução, patogênese e simbiose (RIJKE et al., 2006). Estão envolvidos em mecanismos de resposta contra o estresse, sequestrando ERO produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintéticos, elevada radiação UV, infecção microbiana ou ataque de herbívoro (RIJKE et al., 2006; STALIKAS, 2007).

São formados pela combinação da fenilalanina e ácido acético, por meio da via metabólica do ácido chiquímico. Inicialmente, a fenilalanina é transformada em ácido cinâmico, pela ação da fenilalanina amônia liase (PAL), que é a enzima responsável por ligar os metabolismos primário e secundário. Após a formação do ácido cinâmico, esse é hidroxilado a ácido cumárico que, posteriormente, é transformado em 4-cumaroil-CoA, que é condensado a três (3) unidades de malonil-CoA, gerando uma chalcona a partir da qual todos os flavonoides são formados (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). A estrutura química dos flavonoides está composta de um núcleo de 15 moléculas de carbono, que consiste de dois anéis fenólicos A e B e um anel C (Figura 7), ocorrendo como agliconas, glicosídeos e derivados metilados (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008).

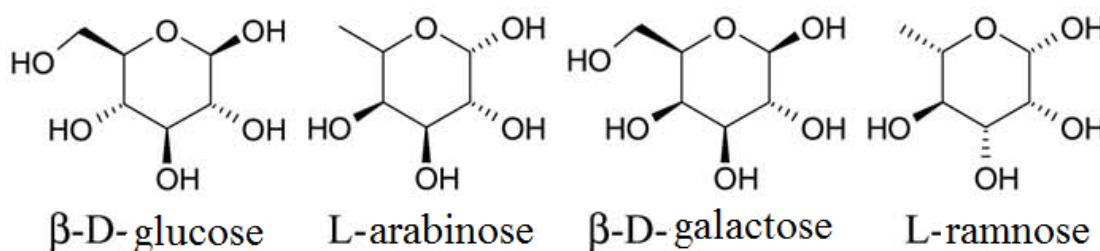
Figura 7 - Imagem ilustrativa da estrutura básica dos flavonoides



Fonte: ADAPTADO DE STALIKAS, 2007

Em plantas, os flavonoides estão frequentemente presentes como O-glicosídeo (com substituintes de açúcar ligados a um grupo hidroxilo da aglicona, normalmente localizada na posição 3 ou 7) e/ou como C-glicosídeos (que têm grupos açúcar ligados a um carbono da aglicona, usualmente 6-C ou 8-C). Os carboidratos mais comuns são ramnose, glicose, galactose e arabinose (Figura 8) (RIJKE et al., 2006).

Figura 8 - Imagens ilustrativas das estruturas dos hidratos de carbono presentes em flavonoides



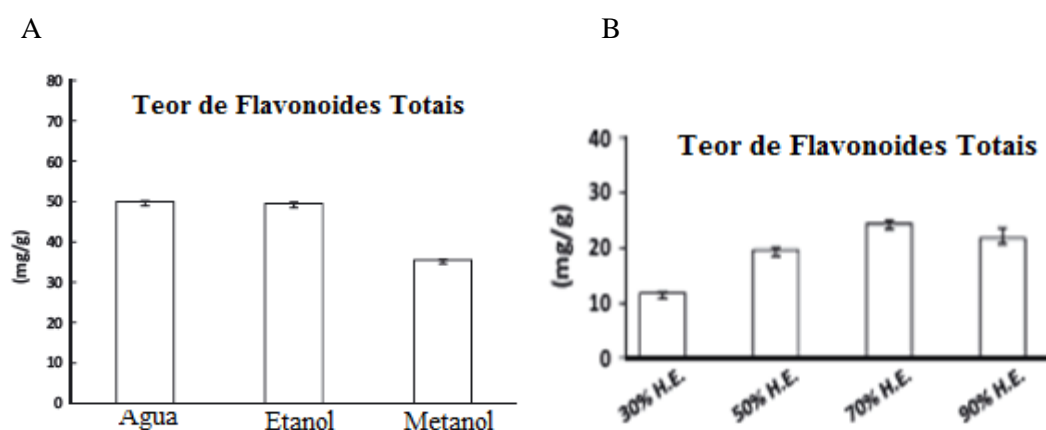
Fonte: ADAPTADO DE RIJKE et al., 2006

Com base nas diferentes estruturas no anel C e como mencionado na página 40, os flavonoides podem ser classificados em seis grupos, a saber: flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (AVIOR et al., 2013; DZIALO et al., 2016; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

O isolamento e a identificação dos flavonoides, bem como a correlação das suas estruturas, muitas vezes são etapas difíceis, devido às semelhanças das suas estruturas e às polaridades que apresentam, mas nos últimos anos, notáveis avanços na descoberta dessas moléculas têm sido realizados devido à combinação de instrumentação robusta, tais como cromatografia líquida e espectrometria de massas (TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Os flavonoides são comumente extraídos de materiais vegetais com metanol, etanol, água, ou sua combinação, mas em alguns casos esses solventes são acidificados a fim de hidrolisar aqueles glicosilados (NACZK; SHAHIDI, 2004). Seo e colaboradores (2013) investigaram o efeito de diferentes solventes sobre a extração destas substâncias das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira). Neste estudo, foram preparados extratos hidroetanólicos das folhas desta espécie vegetal nas proporções de etanol:água (v/v) 70:30, 50:50, 70:30 e 90:10, bem como utilizando etanol, metanol e água. Estes autores relataram que o teor de flavonoides totais dos extratos hidroetanólicos foi superior àquele observado no metanólico. Ainda, entre as quatro proporções etanol:água testadas, o maior valor foi observado com o extrato hidroetanólico a 70% (Figura 9) (SEO et al., 2013).

Figura 9 - Resultado dos valores do teor de flavonoides totais de *Psidium guajava*



A) Resultado dos valores do teor de flavonoides totais das folhas de *P. guajava* utilizando água, etanol e metanol; e B) Resultado dos valores do teor de flavonoides totais das folhas de *P. guajava* utilizando etanol:água 30%, 50%, 70% e 90%.

Fonte: ADAPTADO DE SEO et al., 2013

Quanto à identificação das classes de flavonoides, os espectros de absorção UV-Visível (VIS) fornecem informações sobre a estrutura dessas substâncias devido à presença de fragmentos específicos dos anéis A e B (Figura 7). Assim, a análise desses fragmentos tem sido empregada para a identificação de flavonoides desconhecidos, tendo como base os espectros de absorção UV-VIS e a correlação com aqueles obtidos com os padrões autênticos utilizados (BOUÉ et al., 2003). Os espectros típicos de UV-VIS de flavonoides incluem duas bandas, a saber: 1) banda A, detectada na faixa de comprimento de onda de 300 a 383 nm; e 2) banda B, observada na faixa de comprimento de onda de 250 a 295 nm (TSIMOGIANNIS et al., 2007). A Tabela 2

apresenta as bandas A e B e os comprimentos de ondas onde elas são observadas nas cinco classes de flavonoides.

Tabela 2 - Classes de flavonoides e suas respectivas bandas A e B de absorção e comprimentos de onda

Classe de Flavonoide	Banda B (nm)	Banda A (nm)
Flavona	250 - 290	310 - 350
Flavonol	250 - 290	350 - 385
Flavan-3-ol	250 - 290	300 - 360
Flavonona	277 - 295	300 - 330
Dihidroflavonol	277 - 295	300 - 330

Fonte: ADAPTADO DE TSIMOGIANNIS et al., 2007

De acordo com Bloor (2001), o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é considerado o de escolha para a análise de flavonoides, devido à disponibilidade de comprimentos de ondas que se pode avaliar e ao fato de que a maioria dessas substâncias possui espectros de absorção UV-VIS característicos. Segundo este autor, na maioria das vezes as separações são realizadas utilizando uma coluna de fase reversa e um sistema de eluição gradiente, começando com uma fase predominantemente aquosa e introduzindo uma proporção crescente de um solvente orgânico tal como metanol ou acetonitrilo. Como a maioria dos flavonoides é ionizável, alguns ácidos são geralmente adicionados à fase móvel para controlar o pH (BLOOR, 2001).

Para a caracterização estrutural, o CLAE acoplado à espectrometria de massas (CLAE-MS) tem sido comumente utilizado e a espectrometria de massas por ionização por eletropulverização (ESI-MS) tem sido empregada para confirmação estrutural de compostos fenólicos em ameixas, pêssegos, nectarinas, sementes de uva, alimentos de soja, cacau, azeite e folhas de noz (NACZK; SHAHIDI, 2004).

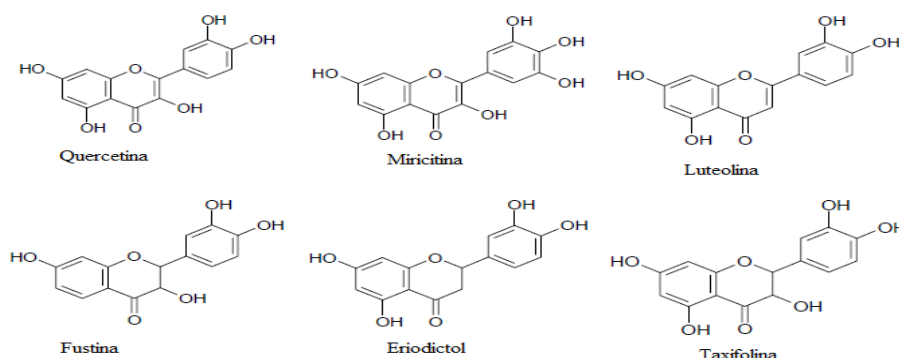
Quanto às atividades biológicas dos flavonoides, segundo Huber e Rodriguez-Amaya (2008) essas propriedades dependem da estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações, tais como glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras alterações, que irão modular a polaridade, toxicidade e o direcionamento intracelular dessas substâncias (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Estas modificações estruturais também interferem na absorção, de modo que os flavonoides

glicosídeos são pouco absorvidos devido à hidrólise por enzimas bacterianas no intestino. No entanto, estudos recentes sugerem que um grau de absorção destas substâncias pode ocorrer no intestino delgado (STALIKAS, 2007).

Entre as diversas atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides estão antioxidante (MACHADO et al., 2008), anti-inflamatória (KIM et al., 2004; ROGERIO et al., 2007), antiviral (COWAN, 1999), antibacteriana (COWAN, 1999) e neuroprotetora (JONES et al., 2012). Jones e colaboradores (2012) mostraram o poder neuroprotetor desta classe química, atribuindo os efeitos positivos à eliminação de radicais, como quelação de metais, ativação de genes de sobrevivência e vias de sinalização, regulação da função mitocondrial e modulação da neuroinflamação (JONES et al., 2012).

Estudos demonstraram que a quercetina possui um excelente potencial antioxidante *in vitro*, sendo o flavonoide com o maior poder sequestrador de ERO. Este elevado poder se deve à presença de catecol no anel B e de hidroxila na posição 3 do anel C (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; ROGERIO et al., 2007). Esta atividade depende da estrutura química da molécula e pode ser determinada por cinco fatores: 1) reatividade como agente doador de H e elétrons; 2) estabilidade do radical flavonoil formado; 3) reatividade frente a outros antioxidantes; 4) capacidade de quelar metais de transição; e 5) interação com as membranas (ALVES et al., 2007). Alguns flavonoides com atividade antioxidante são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Imagem ilustrativa da estrutura química de alguns flavonoides com atividade antioxidante



Fonte: ADAPTADO DE ALVES et al., 2007

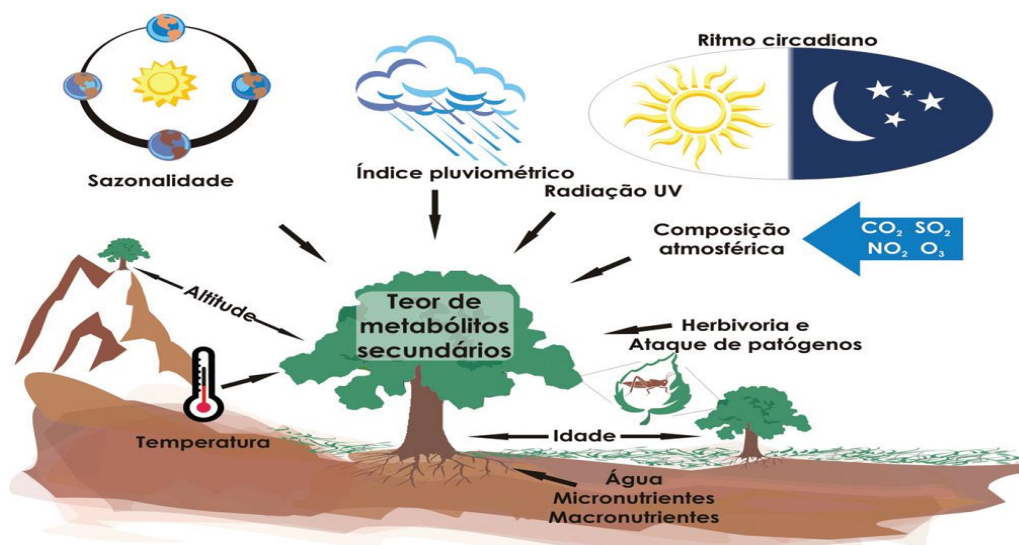
Investigações têm demonstrado, repetidamente, que diferentes moléculas de flavonoides exibem funções anti-inflamatórias e os mecanismos de ação para explicá-las incluem: (1) atividade antioxidante e eliminação de radicais; (2) regulação das atividades celulares relacionada ao processo de inflamação; (3) regulação das enzimas envolvidas no metabolismo de ácido araquidônico (fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase, lipoxigenase) e síntese de óxido nítrico; (4) modulação e produção de outras moléculas pró-inflamatórias; e (5) regulação da expressão gênica pró-inflamatória (GARCÍA-LAFUENTE, 2012).

2.4 METABOLISMO VEGETAL: FATORES QUE PODEM INTERFERIR NO TEOR DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A época em que um material vegetal é coletado implica em um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos, não é constante durante o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), causando diferenças nas funções e aplicações clínicas (YI et al., 2009).

Entre os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários estão a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes (macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Figura 11). Porém, estas variações podem ser decorrentes muitas vezes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos, concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários, levando à uma menor concentração por diluição, podendo, no entanto, resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 11 - Imagem ilustrativa dos fatores que afetam a disponibilidade dos metabólitos secundários



Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007

Há uma bem estabelecida correlação positiva entre a intensidade de radiação de luz e a produção de substâncias tais como flavonoides, taninos e antocianinas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No caso específico dos flavonoides, essas substâncias são acumuladas principalmente em tecidos superficiais e utilizadas pela planta como filtros contra a radiação UV (CRUZ et al., 2011). Cruz e colaboradores (2012) demonstraram como os diferentes níveis de luminosidade podem interferir no conteúdo de flavonoides em *K. brasiliensis*, onde os tratamentos de 70 e 50% de luz apresentaram maiores taxas dessas substâncias (CRUZ et al., 2012).

2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.5.1 Aspectos gerais da atividade antioxidante

2.5.1.1 Estresse oxidativo

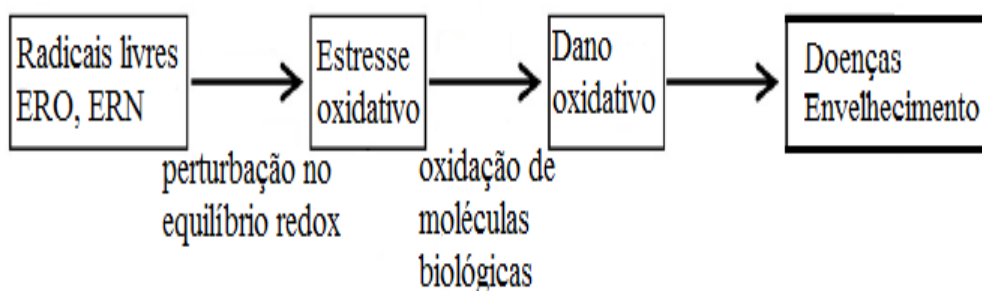
O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de ERO e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), e sua eliminação, realizado por um mecanismo de proteção, é referido como antioxidantes (REUTER et al., 2010), que de acordo com Halliwell

"antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo" (HALLIWELL, 2000)

Estas substâncias podem ser produzidas pelo próprio organismo [antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase; catalisadores hidrofílicos como urato, ascorbato e glutathione] ou ingeridos em alimento (antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, ácido lipídico, polifenóis e carotenoides) (LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; RATNAM et al., 2006).

O estresse oxidativo pode danificar lipídios, proteínas, enzimas, hidratos de carbono e ácido desoxirribonucleico (ADN) em células e tecidos, resultando em dano da membrana, ou fragmentar moléculas aleatoriamente, levando à morte celular induzida por fragmentação de ADN e pela peroxidação de lipídios (Figura 12). Esta consequência contribui para o desenvolvimento de uma série de doenças, como por exemplo, câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios neuronais, Alzheimer, Parkinson, colite ulcerosa, inflamação, envelhecimento e aterosclerose (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; BECKMAN; AMES, 1998; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; RATNAM et al., 2006; REUTER, 2010; SILVA et al., 2012).

Figura 12 - Esquema representativo da cadeia de estresse oxidativo

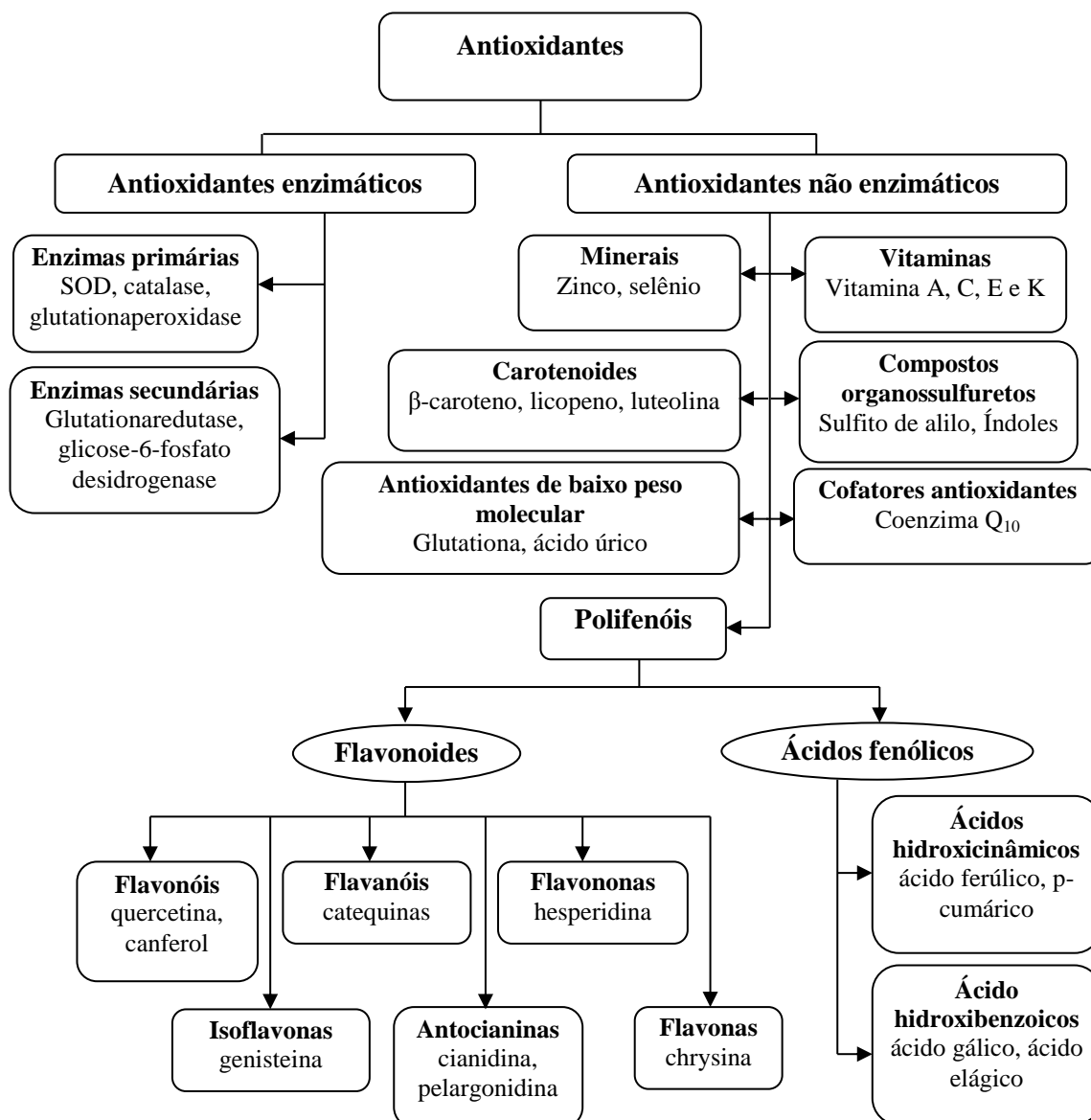


Fonte: ADAPTADO DE NIKI, 2010

Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo (ERO, ERN), que são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias

reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (ALVES et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) (Figura 13).

Figura 13 - Esquema representativo da classificação dos antioxidantes



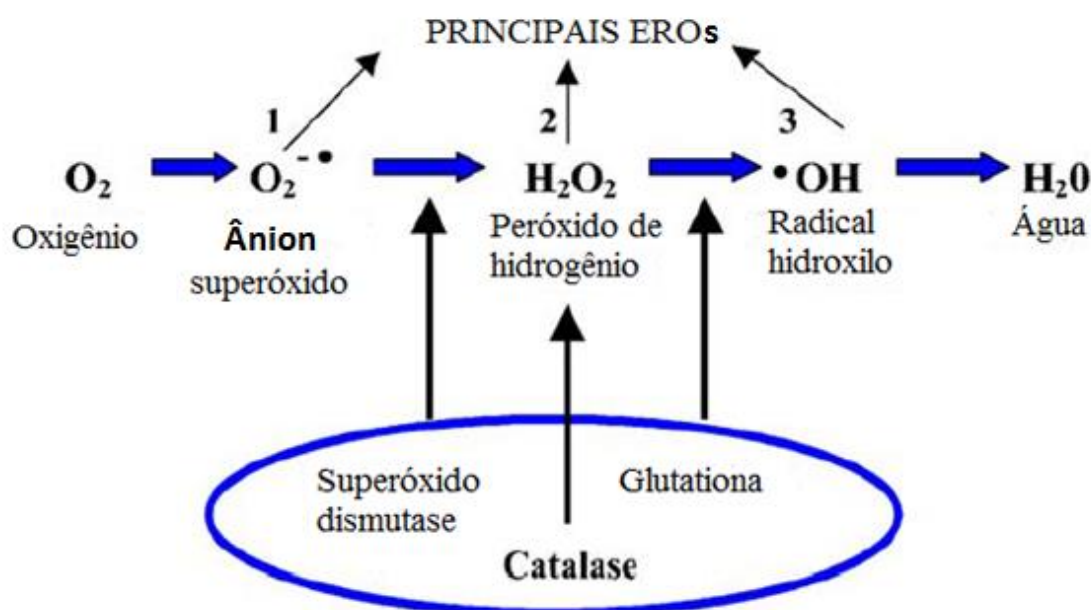
Fonte: ADAPTADO DE RATNAM et al., 2006

As principais EROs se distribuem em dois grupos, radicalares [hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$)] e não-radicalares (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nítrico (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-). Sabe-se que os compostos que pertencem às várias classes de componentes fitoquímicos, tais como fenóis, flavonoides e carotenoides, são

capazes de eliminar radicais livres, tais como O_2^\bullet , OH^\bullet ou radical lipídico peróxido ROO^\bullet em sangue (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FOGLIANO et al., 1999). Os antioxidantes que podem sequestrar estes radicais livres previnem e apresentam alto potencial terapêutico em doenças associadas ao estresse oxidativo.

Os antioxidantes são divididos em duas classes com base no mecanismo de ação, a saber: 1) antioxidantes de quebra-cadeia, que promovem a doação de um elétron que estabiliza o radical livre existente, como vitamina E e β -caroteno, que são encontrados no sangue e nos fluidos do espaço extracelular, onde as enzimas antioxidantes preventivas estão ausentes ou estão presentes em quantidades muito pequenas; e 2) antioxidantes enzimáticos, que sequestram os radicais antes de iniciar uma cadeia de oxidação (SCHEIBMEIR et al., 2005) (Figura 14).

Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo de produção de espécies reativas de oxigênio e seu mecanismo de eliminação através de antioxidantes enzimáticos



Fonte: ADAPTADO DE SCHEIBMEIR et al., 2005

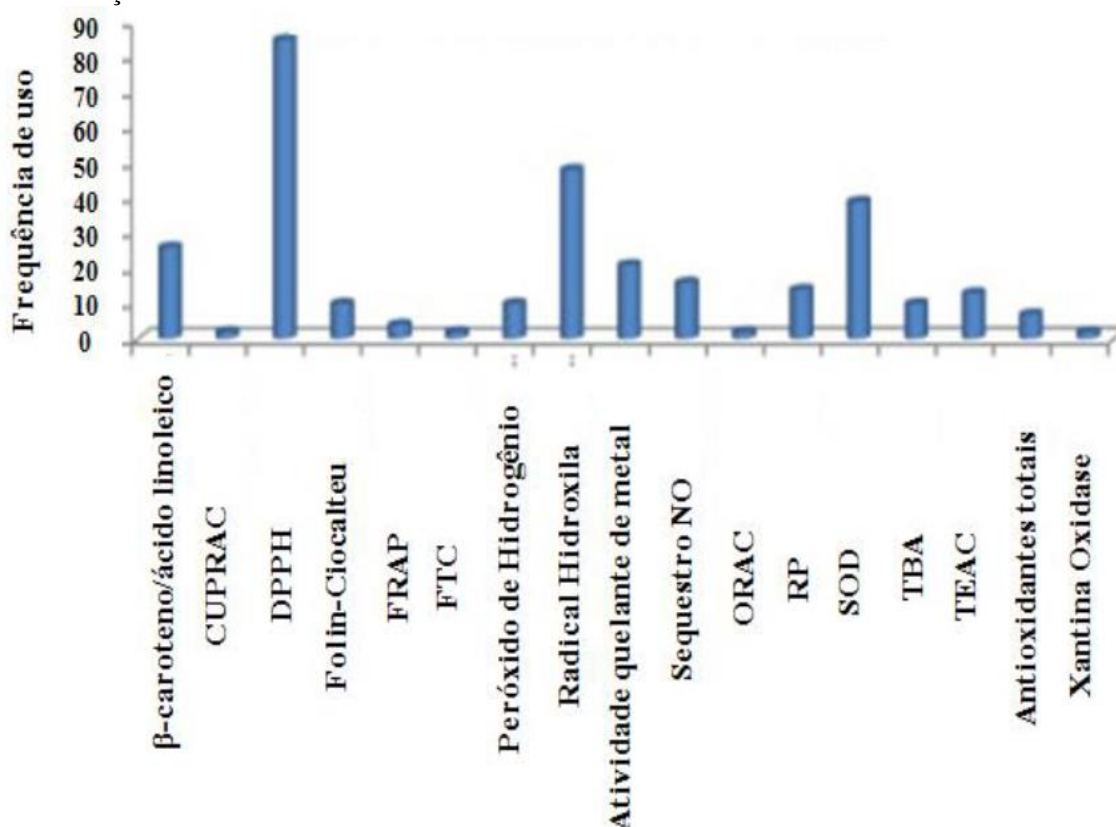
2.5.1.2 Determinação da atividade antioxidante

Considerando a importância científica do descobrimento de novos agentes antioxidantes a serem utilizados na terapêutica, vários métodos com a finalidade de avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais ou substâncias sintéticas têm sido desenvolvidos. Estes métodos podem ser separados em dois grupos, ensaios *in vitro* e *in vivo*, e se baseiam em diversas estratégias: i) no consumo por antioxidantes de radicais

livres estáveis; ii) na capacidade para reduzir íons cúpricos ou férricos; iii) na capacidade de proteger uma molécula alvo exposta a uma fonte de radicais livres; e iv) na capacidade de inibir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Dentre os estudos *in vitro* mais importantes para a investigação da atividade antioxidante estão a co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), radical hidroxila, atividade quelante de metal, superóxido dismutase (SOD), entre outros (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013) (Figura 15).

Figura 15 - Imagem ilustrativa da frequência de utilização de métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante



Fonte: ADAPTADO DE ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAM, 2013

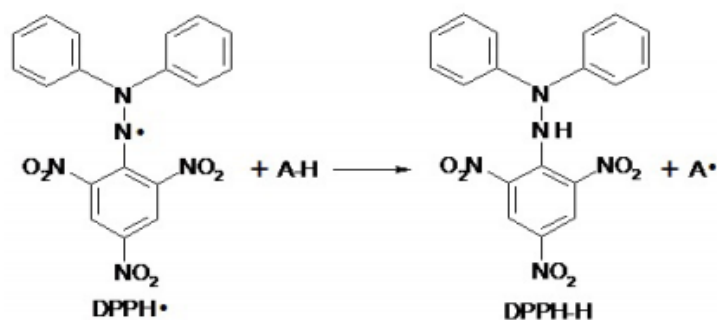
A definição clássica de antioxidante (item 2.5.1.1, pág. 50) é geralmente entendida como a capacidade dessa substância neutralizar radicais livres, como se ilustra na equação (1):



onde AH representa um antioxidante e FR• um radical livre. Assim, a reação (1) é considerada a base do mecanismo clássico de ação e explica a capacidade do antioxidante de inibir (ou desacelerar) muitos processos nocivos induzidos pelas ERO/ERN em lipídios, proteínas ou ADN (LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

A análise do radical livre DPPH• tem sido preliminarmente utilizada na pesquisa com produto natural por ser um método simples e sensível. Descrito pela primeira vez por Blois, em 1958, este método sofreu pequenas modificações, posteriormente, por inúmeros pesquisadores. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o DPPH•, reduzindo-o à hidrazina (Figura 16). Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH•, a hidrazina é obtida com mudança simultânea da coloração de violeta à amarelo pálido, caracterizada por uma banda de absorção em solução de etanol entre 515 - 520 nm (ALVES et al., 2010; CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013).

Figura 16 - Esquema ilustrativo da reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio



Fonte: ADAPTADO DE OLIVEIRA, 2015

A porcentagem do sequestro de radicais livres é calculada utilizando a equação (2):

$$\% \text{ inibição do radical DPPH}\bullet = [(A_{br} - A_{ar}) / A_{br} \times 100] \quad (2)$$

onde A_{br} é a absorção antes da reação e A_{ar} corresponde à leitura da absorbância após a ocorrência da reação (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDA, 2011). O resultado é normalmente expresso utilizando o valor CE_{50} , definido como a concentração de antioxidante que provoca uma diminuição de 50% na absorbância do radical DPPH• (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013).

O ensaio de redução da complexação do fosfomolibdênio é baseado na redução do teor de molibdênio (VI) para molibdênio (V), que ocorre na presença de substâncias antioxidantes com a consequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) em pH ácido e é determinada espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Este método é quantitativo, uma vez que a atividade antioxidante é expressa como o número de equivalentes de ácido ascórbico ou α -tocoferol (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

O teste de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi descrito pela primeira vez por Miller (1971) e é um dos ensaios antioxidante mais adequados para amostras de plantas. Neste ensaio, o ácido linoleico, que é um ácido graxo insaturado, é oxidado pelas ERO produzidas pela água oxigenada. A capacidade antioxidante é determinada pela medida da inibição da produção de compostos orgânicos voláteis e a formação de dieno-hidroperóxidos conjugados resultantes da oxidação do ácido linoleico. O produto formado começa a oxidação do β -caroteno, o que levará a uma descoloração da suspensão. Esta atividade é medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 434 nm. As substâncias padrão mais comumente utilizadas são quercetina, butilhidroxitolueno e α -tocoferol. A atividade antioxidante é calculada como porcentagem de inibição (% I) em relação ao controle, usando a seguinte equação (3):

$$I\% = [1 - (As - As_{120}) / (Ac - Ac_{120})] \quad (3)$$

onde As equivale à absorbância inicial, As₁₂₀ é a absorbância da amostra em 120 min, Ac é a absorção inicial do controle negativo e Ac₁₂₀ é a absorbância do controle negativo a 120 min (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDA, 2011). A eficiência do antioxidante é calculada e expressa através dos valores de F1 e F2 (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995). F1 é calculado no tempo compreendido entre 15 a 45 minutos, pois é a parte da reação em que a formação de radicais peróxidos é maior, avaliando-se a capacidade do antioxidante em agir por mecanismos primários; F2 é calculado no tempo compreendido entre 75 a 105 minutos, pois nesta etapa avançada da reação é possível avaliar a eficiência do antioxidante em agir por mecanismos secundários, interferindo nas reações de formação de produtos secundários da reação de oxidação, lembrando que, quanto mais próximos os valores de F1 e F2 estiverem de 1, menor será a atividade antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; JARDINI; MANCINI, 2007).

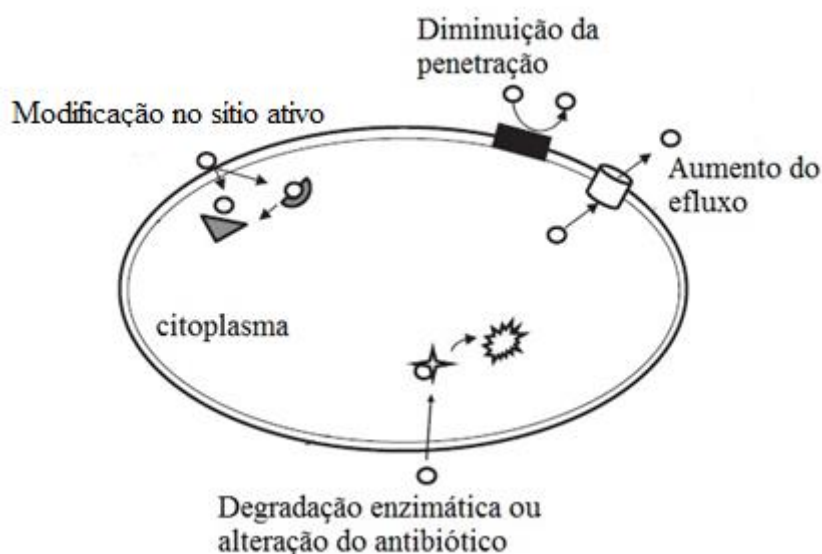
2.5.2 Aspectos gerais da atividade antibacteriana

2.5.2.1 Importância de novos agentes antibacterianos

Desde a descoberta da penicilina por Fleming, em 1929, os antibióticos foram tão bem sucedidos que, ingenuamente, as doenças bacterianas foram consideradas derrotadas (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). No entanto, com o aumento crescente do uso destas substâncias, mais e mais bactérias patogênicas desenvolveram resistência aos seus efeitos inibitórios (BARRIERE, 2015). Consequentemente, apesar de sua eficácia inicial, a maioria dos antibióticos possui uma vida útil limitada (ALANIS, 2005), de tal forma que o *World Economic Forum Global Risks*, em seus relatórios mais recentes, listou a resistência aos antibióticos como uma das maiores ameaças à saúde humana (BLAIR et al., 2015).

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos pode ocorrer de forma natural (intrínseca) ou adquirida (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). Esta adaptação é principalmente ocasionada por quatro mecanismos: a) modificação no sítio ativo do antibiótico, resultando na redução da eficácia no receptor do fármaco; b) inativação ou modificação do antibiótico por enzimas produzidas pelo organismo; c) bombas de efluxo; e d) alteração da permeabilidade da superfície celular (SHELDON, 2005; WRIGHT, 2011) (Figura 17).

Figura 17 - Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos



Fonte: ADAPTADO DE HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008

Em relação ao aumento da resistência aos agentes antibacterianos, existe uma escassez de novas opções em desenvolvimento (BLAIR et al., 2015). Desde 1987, nenhuma nova classe de antibióticos foi descoberta e disponibilizada para o tratamento de infecções bacterianas sistêmicas, e o lançamento de um novo antibiótico tornou-se um evento raro nos últimos anos. Por esta razão, foi encorajador ver seis novos antibióticos aprovados em 2015. Estes antibióticos foram aprovados por meio de incentivos [*Generating Antibiotic Incentives Now (GAIN)*] da *Food and Drug Administration (FDA)*, que visam estimular a pesquisa de novos agentes antibacterianos (The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, disponível em: https://cddep.org/blog/posts/recent_fda_antibiotic_approvals_good_news_and_bad_news/, acessado em 14 de janeiro de 2017).

Nesta busca por novas opções terapêuticas de doenças infecciosas, as plantas têm sido utilizadas por sua habilidade de sintetizar metabólitos secundários, dentre os quais alcaloides, chalconas, compostos aromáticos, cumarinas, esteroides, fenóis, lignanas, peptídeos, terpenos e flavonoides, cujo potencial antimicrobiano tem sido cientificamente explorado (COWAN, 1999; SANTHOSH; SURIYANARAYANAN, 2014). Os flavonoides, por exemplo, têm atividade antibacteriana direta, sinergismo com antibióticos e supressão de virulência bacteriana (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Assim, entre as estratégias utilizadas para superar a resistência microbiana aos antibióticos, tem-se o emprego do efeito combinatório de substâncias, os agentes modificadores ou moduladores de resistência (substâncias que podem potencializar a atividade de um antibiótico sobre cepas resistentes). Vale a pena ressaltar que existe relato da atividade sinérgica de extratos de plantas ou seus fitoconstituintes, como por exemplo: i) timol e carvacrol, que incrementam a permeabilidade celular, facilitando, dessa maneira, a entrada dos antibióticos no citoplasma; e ii) reserpina, que inibe a bomba de efluxo (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Porém, apesar dos esforços pela busca de novas opções terapêuticas e de novos agentes antimicrobianos, o problema cresce dia após dia e as perspectivas para a utilização de agentes antimicrobianos no futuro ainda estão incertas. Assim, outras medidas devem ser tomadas para minimizar o evento de resistência, tais como controlar a utilização de antibióticos, desenvolver investigação para compreender melhor os mecanismos genéticos de resistência, e continuar os estudos de desenvolvimento de novos medicamentos, sejam sintéticos ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Neste sentido, a otimização de métodos de triagem utilizados para a identificação de agentes antimicrobianos a partir de fontes naturais é de grande importância (VALGAS et al., 2007).

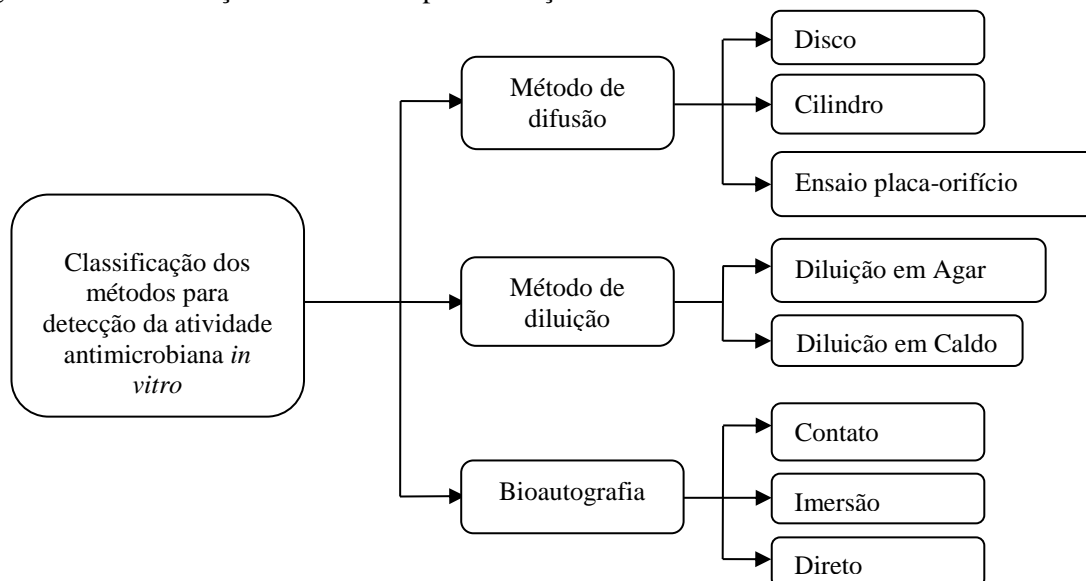
2.5.2.2 *Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana*

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pode ser usado para a descoberta de medicamentos, epidemiologia e previsão do esquema terapêutico mais apropriado, mas uma das dificuldades para os investigadores nessa área do conhecimento é a falta de um método padronizado e validado para realizar investigações *in vitro* de extratos e de substâncias puras, ambos obtidos de plantas, como potenciais agentes antimicrobianos (BOLUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). De modo geral, os testes para investigação da atividade antibacteriana *in vitro* se baseiam naqueles adotados para fármacos convencionais. Porém, vários fatores podem afetar o ajuste destes protocolos quando são utilizados extratos e substâncias puras, incluindo o tipo de microrganismo a ser testado, concentração do inóculo, tipo de meio de cultura e natureza dos extratos a serem testados (BURT, 2004; WILKINSON, 2006).

São três os métodos disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais, a saber: bioautográfico, difusão e diluição (CHOMA; GRZELAK, 2011) (Figura 18). Os ensaios de bioautografia e difusão implicam em técnicas qualitativas, visto que informam sobre a presença ou ausência de substâncias ativas com potencial antimicrobiano. O método de diluição, por outro lado, é um teste quantitativo, pois permite determinar a CIM, definida como a menor concentração de uma substância capaz de inibir visualmente o crescimento de um microrganismo (CLSI, 2012; VALGAS et al., 2007).

Ao examinar extratos contendo fitoconstituintes desconhecidos, interferências podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos, visto que o efeito antimicrobiano pode ser inibido ou aumentado por fatores extrínsecos ou contaminantes. Assim, a principal vantagem do método de diluição é a possibilidade de estimar a concentração da substância difundida no ágar ou em caldo que apresenta efeito inibitório de microrganismos. O campo de aplicação inclui extratos complexos, substâncias puras e amostras tanto polares quanto não polares (ELOFF, 1998; CHOMA; GRZELAK, 2011).

Figura 18 - Classificação dos métodos para detecção da atividade antimicrobiana *in vitro*



Fonte: ADAPTADO DE CHOMA; GRZELAK, 2011

Adicionalmente, o aprofundamento da investigação da atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias de fonte natural pode ser efetuado por meio de cinética microbiana ou *time-kill test*, método mais apropriado para se determinar o efeito bactericida ou fungicida, sendo considerado uma forte ferramenta para obtenção de informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e a cepa microbiana. O *time-kill* revela um efeito antimicrobiano dependente do tempo e da concentração (BOLUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

2.5.3 Aspectos gerais da atividade anti-inflamatória

A pele, como interface com o meio externo, tem um papel importante de proteção, termorregulação e resposta imunológica, bem como na manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita aos estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos e químicos e resposta autoimune. Estes estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória (BECKER, 1997; FIRESTEIN, 2004).

A resposta inflamatória implica em um processo biológico intimamente orquestrado em sintonia com o sistema imunológico, que pode ser induzido por uma infecção microbiana ou lesão do tecido, resultando na permeação de plasma e leucócitos para o local da lesão ou infecção (FERGUSON, 2010; GARCÍA-LAFUENTE, 2009). A

lesão cutânea provoca a ativação de queratinócitos, proliferação e liberação dos mediadores inflamatórios, tais como óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (ANTUNES-RICARDO et al., 2015; CONFORTI et al., 2008).

De acordo com a literatura, são duas as fases da inflamação: aguda e crônica. A primeira fase corresponde a uma etapa inicial medida por meio da ativação do sistema imunológico, que persiste por um curto período de tempo, sendo normalmente benéfica para o hospedeiro, como no caso de feridas e infecções (sem a ativação do processo inflamatório, esses quadros nunca iriam se curar). Se a inflamação dura por um longo período de tempo, a segunda fase é ativada, o que predispõe o hospedeiro às várias doenças crônicas, incluindo câncer (PHANSE et al., 2012; REUTER et al., 2010).

Diferentes modelos de inflamação têm sido usados para determinar e compreender os mecanismos de ação de substâncias sintéticas ou obtidas a partir de fontes naturais sobre os mediadores pró-inflamatórios e marcadores bioquímicos, tais como modelos de inflamação cutânea e dor, de inflamação não artrítica e dano aos tecidos e de artrite em animais (ANTUNES-RICARDO et al., 2015; GÁBOR, 2003).

O método de edema de orelha tem sido amplamente utilizado para a investigação de novos medicamentos anti-inflamatórios por permitir a identificação de potenciais substâncias como agentes anti-inflamatórios, podendo o edema de orelha ser induzido por diferentes agentes flogísticos ou irritantes (óleo de Cróton, capsaicina, ácido araquidônico, fenol, entre outros) (ANTUNES-RICARDO et al., 2015).

O óleo de Cróton fornece dados em relação à atividade anti-eritematosa em um processo inflamatório agudo. Seu constituinte principal é o éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), cuja aplicação tópica local estimula o edema, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares e hiperproliferação epidérmica, tais como as prostaglandinas E₂ (PGE₂), leucotrieno B₄ (LTB₄), histamina, serotonina e IL-1 (PACHECO et al., 2014). Ocorre, ainda, ativação da proteína quinase C (PKC) (WANG et al., 2001) e fosfolipase A₂ (KAST; FURSTENBERGER; MARKS, 1993), indução da ciclo-oxigenase (SANCHEZ; MORENO, 1999; SCHOLZ et al., 1995) e translocação ou ativação de lipoxigenase (WERZ et al., 2001). Além disso, não apenas os inibidores da ciclo-oxigenase ou da 5-lipoxigenase, mas também os antagonistas do LTB₄ inibem o edema de pele induzido por TPA (MURAKAWA et al., 2006). Estes

achados sugerem que os eicosanoides desempenham um papel importante no processo inflamatório da pele induzido pelo TPA (MURAKAWA et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a composição química e as atividades antioxidante e antibacteriana *in vitro* e a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae), com o intuito de obter evidências científicas que possam subsidiar os usos medicinais pela população.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Seguem os objetivos específicos norteados pela proposta geral supramencionada:

- a) Obter os extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *K. brasiliensis* coletadas em janeiro e em setembro de 2016;
- b) Obter o perfil químico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) para os extratos de janeiro e setembro;
- c) Determinar o teor de fenóis e flavonoides totais para os extratos de janeiro e setembro;
- d) Investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos por meio do método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), redução da complexação do fosfomolibdênio e co-oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico para os extratos de janeiro e setembro;
- e) Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos de *K. brasiliensis* por meio das determinações da CIM, da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático para os extratos de janeiro e setembro;
- f) Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos de *K. brasiliensis* usando o modelo de edema de orelha induzido pelos agentes flogísticos óleo de Cróton, histamina e fenol, assim como determinar os marcadores inflamatórios dos extratos 50% e 70% de janeiro.

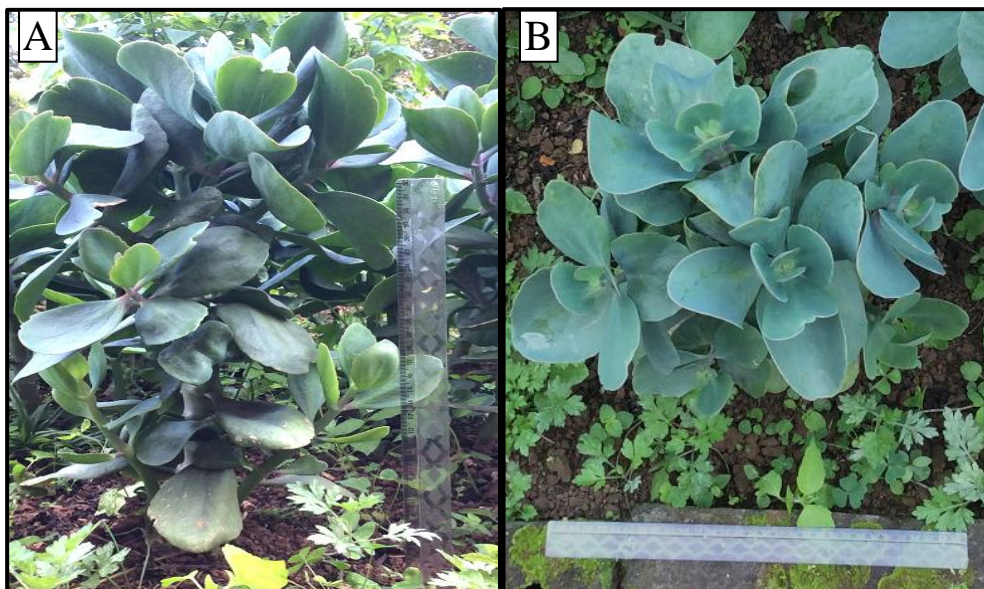
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas frescas de *K. brasiliensis* foram coletadas da planta cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, latitude 21°26'40" Sul e longitude 43°22'1" Oeste, às 08:30 horas dos dias 07 de janeiro (1ª coleta) e 22 de setembro de 2016 (2ª coleta), correspondente às estações de verão e primavera, respectivamente. A espécie vegetal não apresentava floração em ambas às épocas de coleta. Uma exsicata (CESJ nº 43980), identificada pelo Dr. Marcus Alberto Nadruz Coelho, Pesquisador Titular do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ)/UFJF. As folhas coletadas em janeiro e em setembro de 2016 foram selecionadas pela exclusão daquelas deterioradas e, em seguida, foram pesadas para posterior preparo dos extratos hidroetanólicos 30% (EHJ30), 50% (EHJ50) e 70% (EHJ70) e 30% (EHS30), 50% (EHS50) e 70% (EHS70), nessa ordem. O nome da planta *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. foi verificado no sítio eletrônico da *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-8902741>, acessado em 01 de março de 2016), sendo sinônimo de *Kalanchoe laciniata* (L.) DC.

De acordo com os dados obtidos no sítio eletrônico da Companhia de Saneamento Municipal (CESAMA) de Juiz de Fora, o clima nesse município é mesotérmico, com verões quentes e moderadamente chuvosos e invernos secos não rigorosos, sendo classificado como tipo Cwa (subtropical), segundo o sistema Köppen e Geiger (1928). No entanto, a área de abrangência do Bairro São Pedro, onde se encontra o campus da UFJF bem como o Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia dessa Instituição, devido a maior altitude e afastamento da zona urbana concentrada, tem verões mais amenos e clima classificado como Cwb (subtropical de altitude). A cidade apresenta altitudes médias de 700 a 900 metros e, segundo dados gerados pela Estação Climatológica Principal da UFJF/5º DISME (nº 83692), a temperatura anual média gira em torno de 18,9 °C, sendo fevereiro o mês mais quente e julho o mais frio; os índices pluviométricos médios nas últimas décadas foram próximos a 1536 mm, sendo janeiro o mês mais chuvoso (CESAMA, 2013).

Figura 19 - Fotografia de *Kalanchoe brasiliensis* cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora



A: imagem frontal de *Kalanchoe brasiliensis* observada na primeira coleta (07 de janeiro de 2016; verão); B: imagem vertical de *Kalanchoe brasiliensis* observada na primeira coleta (07 de janeiro de 2016; verão).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

Os extratos hidroetanólicos das folhas de *K. brasiliensis* foram obtidos pelo método preconizado por Costa e colaboradores (2014), com pequenas modificações. Folhas frescas (0,3 kg) coletadas em 07 de janeiro (1ª coleta) e em 22 de setembro de 2016 (2ª coleta) foram extraídas com etanol P.A. (99,5%) (Biotec, Pinais, PR, Brasil) nas concentrações de 30%, 50% e 70% etanol:água (v/v) (SEO et al., 2014) em uma proporção de 1:1 (p/v) utilizando um triturador mecânico. Em seguida, estes extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% obtidos das folhas coletadas em janeiro (EHJ30, EHJ50 e EHJ70, respectivamente) e setembro (EHS30, EHS50 e EH70S, nessa ordem), foram filtrados em papel de filtro comum e concentrados à temperatura de 45 °C empregando evaporador rotativo (R-215 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suíça). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa.

4.3 INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

Para investigação da composição química, os extratos EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foram avaliados por CLAE-DAD em cromatógrafo *Agilent Technologies 1200series* com detector UV-DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa Zorbax-SBC₁₈ (4,6 mm x 150 mm, 5 µm). Como fase móvel, utilizou-se um gradiente linear de 0 - 30 min com água/metanol grau CLAE (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (95:5 à 10:90). O volume de injeção foi de 20 µL e a taxa de fluxo manteve-se constante a 0,8 mL/min com uma concentração de amostras de 1 mg/mL. A detecção foi realizada por meio de um detector UV-DAD ajustado aos comprimentos de onda 230, 254, 280 e 330 nm, e os espectros UV foram obtidos por varredura na faixa de 190 à 400 nm. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos localizado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elita Scio Fontes.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Para determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Denis (1912), com pequenas modificações. Para tanto, foram preparadas soluções-estoque (SEs) de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 a 2 mg/mL em água destilada. Em tubos de ensaio previamente identificados, foram adicionados 300 µL das SEs, 500 µL de água destilada e 500 µL do reagente de Folin-Denis, em triplicata. Posteriormente, estas misturas foram agitadas e, após 30 min, foram adicionados 500 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio, procedendo-se à agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 min a 3000 rpm. Uma alíquota de 250 µL foi retirada de cada tubo e transferida para poços de microplacas de 96 poços. A leitura foi realizada em 760 nm. Foi utilizada água destilada como branco. Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de ácido tânico (substância de referência) (3,33; 6,67; 10; 13,33; 16,67; 26,67; 53,33; e 106,67 µg/mL) nas mesmas condições descritas para as SEs dos extratos. Para obtenção da reta

de calibração e equação da reta, bem como da determinação do coeficiente de correlação (R^2) através da análise de regressão linear (*Excel for Windows*) pelo método dos mínimos quadrados, foram utilizadas as médias das absorbâncias das concentrações de ácido tânico, onde o valor de Y foi substituído pelas absorbâncias dos extratos e os resultados foram expressos em mg/g do extrato equivalente à ácido tânico (EAT). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos localizado no Departamento de Bioquímica do ICB da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elita Scio Fontes.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada através de método espectrofotométrico na região do visível utilizando cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e rutina como substância de referência, conforme descrito por Sobrinho e colaboradores (2008), com adaptações no solvente e nos volumes finais das soluções. Para construção da curva de calibração, inicialmente foi preparada SE de 0,5 mg/mL de rutina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA) em etanol 99,5%. A partir desta SE, foram preparadas diluições em concentrações entre 2 a 25 μ g/mL, a saber: para uma série de tubos de ensaio 13 x 100 mm devidamente identificados, foram transferidas alíquotas de 20, 50, 100, 150, 200 e 250 μ L da SE, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de etanol 99,5%, 120 μ L de ácido acético P.A. (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 2 mL de piridina (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 20% (v/v) em etanol 99,5%, 500 μ L de cloreto de alumínio hexa-hidratado (F. Maia S.A.®) a 8% (m/v) em etanol 99,5%, completando o volume para 5 mL com água destilada (Tabela 3). O preparo do branco de cada uma das concentrações foi realizado pela adição dos reagentes, com exceção de rutina. Este mesmo procedimento foi realizado, em triplicata, para EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 a partir de SEs de 1 mg/mL em uma mistura de água:etanol (3:7) para favorecer a solubilidade. Após 30 min. à temperatura ambiente, as leituras das absorbâncias das soluções de rutina e extratos foram registradas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) a 412 nm. Foram utilizadas as médias das absorbâncias das concentrações de rutina para se obter a reta de calibração e para se determinar o coeficiente de correlação (R^2) através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (*Excel for Windows*). O teor de flavonoides totais foi determinado em mg/g de amostra equivalente a rutina

(ER). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa.

Tabela 3 - Esquema do preparo de diluições empregadas para a determinação do teor de flavonoides totais

Tubo para Teste	Rutina (µL)	Etanol (µL)	Amostra (µL)	Ácido Acético (µL)	Piridina (µL)	AlCl₃ (µL)	Água (µL)	Concentração (µg/mL)
A	20	400	-	120	2000	500	1960	2
B	50	400	-	120	2000	500	1930	5
C	100	400	-	120	2000	500	1880	10
D	150	400	-	120	2000	500	1830	15
E	200	400	-	120	2000	500	1780	20
F	250	400	-	120	2000	500	1730	25
EHJ30	-	400	1500	120	2000	500	480	300
EHJ50	-	400	1500	120	2000	500	480	300
EHJ70	-	400	1500	120	2000	500	480	300
EHS30	-	400	1500	120	2000	500	480	300
EHS50	-	400	1500	120	2000	500	480	300
EHS70	-	400	1500	120	2000	500	480	300
Branco	-	400	-	120	2000	500	1980	-

AlCl₃: Cloreto de Alumínio; EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

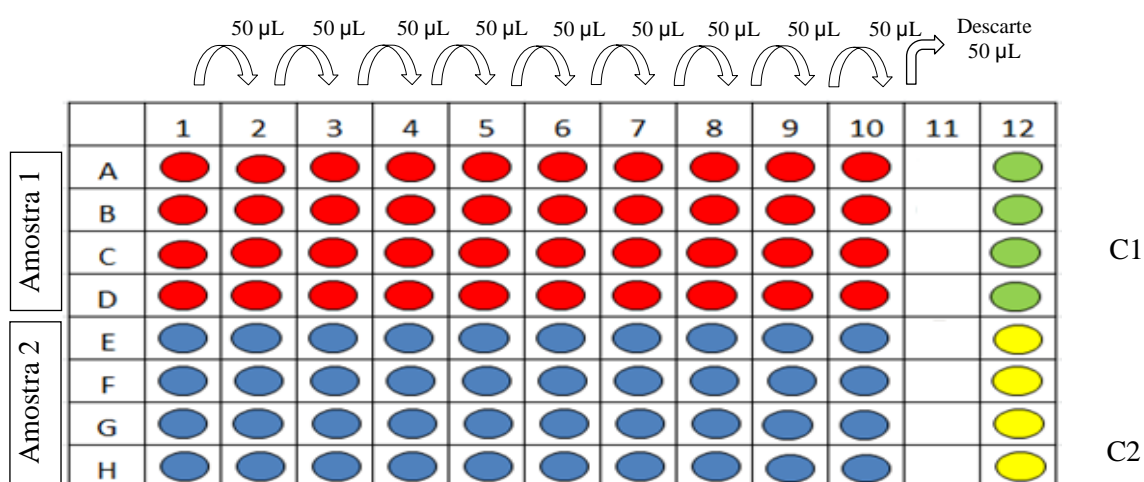
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

4.6.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)

A atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH• (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA), segundo Blois (1958), com pequenas modificações. Inicialmente, foram preparadas SEs dos extratos a 1 mg/mL em água destilada e das substâncias de

referência quercetina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA) e ácido ascórbico (Cromoline Química Fina, Diadema, SP, Brasil) a 1 mg/mL em metanol (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas a partir das SEs, obtendo-se um gradiente de concentração de 0,98 a 500 µg/mL. Para isto, foram transferidos 100 µL das SEs dos extratos e das substâncias de referência para uma série de poços da microplaca (coluna 1), em triplicata. Logo após, foram adicionados 50 µL de metanol da coluna 2 até a 10. Em seguida, alíquotas de 50 µL foram retiradas da coluna 1, transferidas para as subsequentes, e assim sucessivamente, até a de número 10, quando se procedeu ao descarte desse volume, conforme mostra a Figura 20. Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução de DPPH 20 µg/mL em metanol, e incubou-se a microplaca por 60 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Na fileira D, foram adicionados todos os reagentes mencionados, com exceção da solução de DPPH, a qual foi substituída por água destilada e metanol, correspondendo ao branco dos extratos (amostras) e das substâncias de referência (controles), nessa ordem. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan, GO) a 517 nm. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos localizado no Departamento de Bioquímica do ICB da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elita Scio Fontes.

Figura 20 - Esquema da diluição seriada realizada em microplaca para determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)



C1: controle negativo (DPPH em metanol) (cor verde); C2: controle negativo [extrato (amostra) em água destilada] (cor amarela);

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Com base no conhecimento de que a absorvância dos extratos (amostras) em água destilada é igual à média aritmética das triplicatas das absorvâncias menos o branco das amostras, obteve-se a porcentagem de inibição (%I) para cada concentração através da equação:

$$\%I = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \times 100$$

onde A_{DPPH} equivale à absorvância da média aritmética das triplicatas de DPPH e $A_{amostra}$ à absorvância da média aritmética das triplicatas das amostras. Após o cálculo das %I das amostras e controles, os valores foram usados para construção dos gráficos, cujas abscissas corresponderam à concentração das amostras ou controles e as ordenadas à %I. A CE_{50} foi calculada usando o *software* GraphPad Prism[®]5; assim, quanto maior a redução do DPPH promovida por uma amostra, menor a CE_{50} observada.

4.6.2 Método de redução da complexação do fosfomolibdênio

A atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi também avaliada pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio segundo Prieto, Pineda e Aguilar (1999), com pequenos ajustes. O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação de fosfato de sódio (Na_3PO_4) (28 mL; 0,1 mol/L), molibdato de amônio [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$] (12 mL; 0,03 mol/L) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (20 mL; 3 mol/L) em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL (solução reagente). A coloração desta solução inicialmente amarelada torna-se verde à medida que ocorre a redução, sendo a intensidade dessa cor proporcional à redução ocorrida. Para a realização deste método, tubos de ensaio 11 x 75 mm foram devidamente identificados e adicionados de 2 mL da solução reagente descrita e 300 μ L dos extratos e do ácido ascórbico (0,2 mg/mL em água destilada), em triplicata. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, 250 μ L foram transferidos para poços de microplaca de 96 poços e as absorvâncias foram medidas em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan, GO) a 695 nm. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante foram expressos em termos percentuais na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%) e os cálculos foram estabelecidos por meio da equação:

$$AAR\%(\text{ácido ascorbico}) = \frac{\text{Absamostra} - \text{Absbranco}}{\text{Absácido ascórbico} - \text{Absbranco}} \times 100$$

onde *Absamostra* equivale à absorvância da média aritmética das triplicatas de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 e *Absácido ascórbico* à absorvância da média aritmética das triplicatas de ácido ascórbico. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos localizado no Departamento de Bioquímica do ICB da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elita Scio Fontes.

4.6.3 Método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi avaliada, ainda, pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (substrato) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA), conforme descrito por Melo e Mancini Filho (1989), com pequenas adaptações. Para preparo da emulsão β -caroteno/ácido linoleico, foram adicionados 20 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA), 50 μ L de solução β -caroteno (10 mg/mL) e 1 mL de clorofórmio (Synth, Diadema, SP, Brasil) em um balão redondo. Logo após homogeneização, procedeu-se à evaporação do clorofórmio empregando evaporador rotativo a 40 °C (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Posteriormente, foram acrescentados 20 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 30 min. A absorvância desta emulsão foi inicialmente medida em 470 nm e ajustada entre 0,6 e 0,7. Após esta aferição, em microplaca de 96 poços foram adicionados 250 μ L da emulsão e 10 μ L dos extratos (amostras) a uma concentração de 38,4 μ g/mL em água destilada. Esta microplaca foi mantida a uma temperatura de 45 °C e, após, foram realizadas medidas das absorvâncias em leitor de microplacas a 470 nm a cada 15 min durante 120 min (t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} , t_{105} e t_{120}), sendo a primeira leitura (t_0) realizada imediatamente após a adição das alíquotas das amostras nos poços. Ao final, foram obtidas nove leituras para monitoramento do processo de co-oxidação do β -caroteno. Os ensaios foram realizados em triplicata. A partir das leituras das absorvâncias obtidas, foram construídos gráficos de decaimento da absorvância em função do tempo e determinou-se a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) utilizando a equação:

$$\%I = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100$$

onde $A_{controle} = \text{Abscontrole } t_0 - \text{Abscontrole } t_{120}$ e $A_{amostra} = \text{Absamostra } t_0 - \text{Absamostra } t_{120}$. Quercetina (38,4 µg/ mL) foi utilizada como substância de referência; metanol foi empregado como controle da oxidação para a quercetina, e água destilada para as amostras. Adicionalmente, foi calculada a eficiência da atividade antioxidante dos extratos pelo método do cálculo das tangentes das curvas obtidas no sistema β-caroteno/ácido linoleico, obtendo-se os fatores cinéticos F1 e F2, calculados nos tempos compreendidos entre 15 e 45 min e 75 a 105 min, nessa ordem (JARDINI; MANCINI, 2007), utilizando a seguinte equação:

$$F = \frac{a/b}{A/B}$$

onde (a) e (A) são os catetos opostos, obtidos através da diferença das leituras das absorbâncias da amostra e do branco, respectivamente; (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos através da diferença entre os tempos da amostra e do branco, nessa ordem, de acordo com o fator cinético calculado (JARDINI; MANCINI, 2007). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos localizado no Departamento de Bioquímica do ICB da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elita Scio Fontes.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

A atividade antibacteriana *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi investigada por meio da determinação da CIM empregando-se o método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012, 2014), bem como através do estabelecimento da CBM e da classificação do efeito antibacteriano em bactericida ou bacteriostático, conforme método descrito por Andrews (2001), com pequenos ajustes. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Silvana Alves.

Para realização dos procedimentos microbiológicos foram empregadas cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®), na segunda

passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, a saber:

Cepa de Referência	Abreviatura Adotada no Texto
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC® 6538™)	<i>S. aureus</i> (ATCC® 6538)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC® 29213™)	<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	<i>E. coli</i> (ATCC® 10536)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)	<i>E. coli</i> (ATCC® 25922)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Cholerasuis (ATCC® 10708™)	<i>S. Cholerasuis</i> (ATCC® 10708)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (ATCC® 13311™)	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 9027)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853)

Com base nos resultados obtidos com as cepas de referência testadas e no levantamento atualizado da literatura, foram realizados ensaios microbiológicos adicionais empregando cepas de rotina visando o aprofundamento da investigação dessa atividade biológica de *K. brasiliensis*. Assim, cepas de rotina de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis e de *Salmonella* spp. resistente à fluoroquinolona, isoladas de infecções sanguíneas (MRSA) e sanguíneas e urinárias (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis e de *Salmonella* spp. resistente à fluoroquinolona) de pacientes atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Comitê de Ética em Pesquisa Humana do HUCFF sob número 976.427), identificadas pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Durham, NC, EUA) e gentilmente cedidas pela MSc. Adriana Lúcia Pires Ferreira, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica dessa Instituição, também foram testadas, a saber:

Cepa de Rotina	Abreviatura Adotada no Texto
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1485279	MRSA 1485279
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1605677	MRSA 1605677
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1664534	MRSA 1664534
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1688441	MRSA 1688441
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1830466	MRSA 1830466
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1406591	S. Enteritidis 1406591
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1418594	S. Enteritidis 1418594
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis 1428260	S. Enteritidis 1428260
<i>Salmonella</i> spp. 1266695	<i>Salmonella</i> spp. 1266695
<i>Salmonella</i> spp. 1507708	<i>Salmonella</i> spp. 1507708

Conforme preconizado pelos documentos M07-A9 e M100-S24 (CLSI, 2012, 2014), *S. aureus* ATCC® 29213, *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 são cepas empregadas como controle de qualidade, de fonte confiável, recomendadas, dessa forma, para garantir e validar a qualidade dos ensaios microbiológicos. A Tabela 4 apresenta os intervalos dos valores de CIM estabelecidos pelo CLSI (2014) para estas cepas frente aos antibióticos (ANTs) ampicilina sódica (AMP) e cloranfenicol (CHL) na concentração de 10 e 30 µg/mL, respectivamente, obtidos em testes de susceptibilidade aos antimicrobianos devidamente validados.

Tabela 4 - Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para controle de qualidade do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos de organismos não fastidiosos

ANT	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853
AMP	0,5 – 2,0 µg/mL	2,0 – 8,0 µg/mL	Não reportado
CHL	2,0 – 16,0 µg/mL	2,0 – 8,0 µg/mL	Não reportado

ANT: antibiótico; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol.

Fonte: ADAPTADO DO DOCUMENTO M100-S24 (CLSI, 2014)

O armazenamento das cepas de referência e de rotina foi feito por meio da manutenção das mesmas como suspensões em solução contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Synth) a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada cepa foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 horas) diretamente em 1,0 mL de solução LDG distribuída previamente em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de 20 °C negativos até a realização dos ensaios biológicos.

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo conforme documento M07-A9 (CLSI, 2012), com pequenos ajustes. Para obtenção das SEs de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50, EHS70 e dos ANTs usados como referência [AMP e CHL (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA)] foram empregados diferentes sistemas solvente/diluyente, obtendo-se concentrações finais de 12,5 mg/mL e 1,25 mg/mL para as SEs dos extratos e ANTs, respectivamente. A Tabela 5 apresenta os diluentes e solventes empregados para este propósito, conforme recomendações do documento M100-S24 (CLSI, 2014).

Tabela 5 - Descrição da composição das soluções-estoque empregadas para investigação da atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 e de ampicilina e cloranfenicol por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo

SE	Solvente	Diluyente	Concentração Final SE (mg/mL)
EHJ30 / EHJ50 / EHJ70 EHS30 / EHS50 / EHS70	-	Água destilada estéril	12,5
AMP	Tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0	Tampão Fosfato 0,1 M pH 6,0	1,25
CHL	Etanol 95%	Água destilada estéril	1,25

SE: Solução-estoque; AMP: Ampicilina, CHL: Cloranfenicol; EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

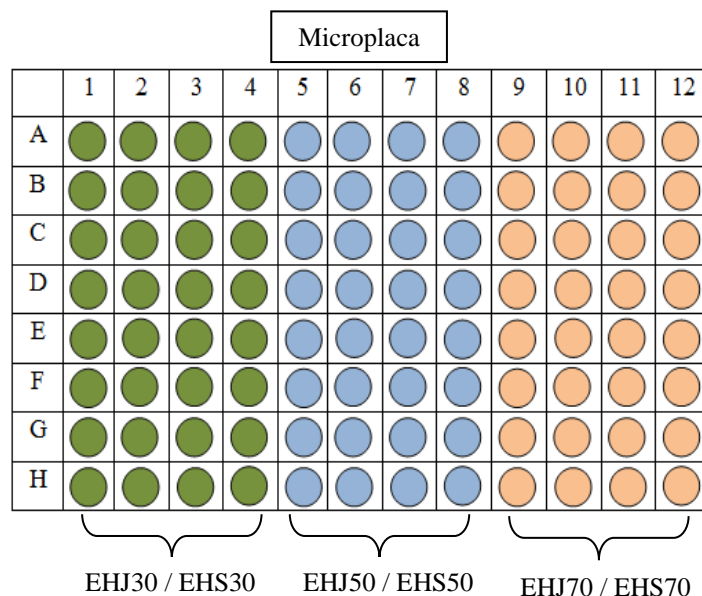
Fonte: ADAPTADO DE FERES-NETTO, 2016; ADAPTADO DE CLSI, 2014

Para o preparo das suspensões bacterianas, as cepas de referência e de rotina foram inicialmente ativadas em ágar Müeller-Hinton (AMH) (Himedia Laboratories[®], Mumbai, Índia) e incubadas por 16 a 18 horas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C, em aerobiose. Após incubação, 3 a 5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram transferidas para um tubo de ensaio 13 x 100 mm contendo 3,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) e comparadas e ajustadas visualmente à escala padrão 0,5 de McFarland (DME Diagnósticos Microbiológicos Especializados[®], São Paulo, SP, Brasil) (CLSI, 2012). O método para determinação da CIM foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato, utilizando-se uma microplaca para EHJ30,

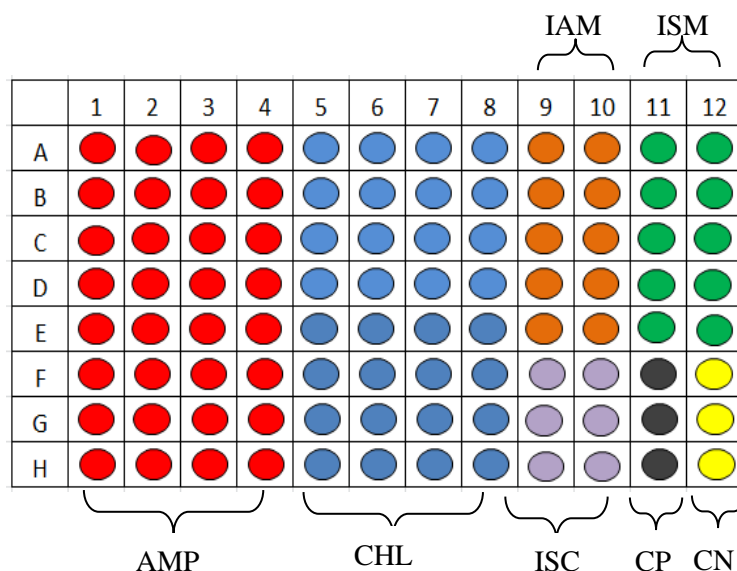
EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 (Figura 21a) e outra para os controles (Figura 21b) para cada cepa testada.

Figura 21 - Imagem ilustrativa da organização das microplacas utilizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016

(a)



(b)

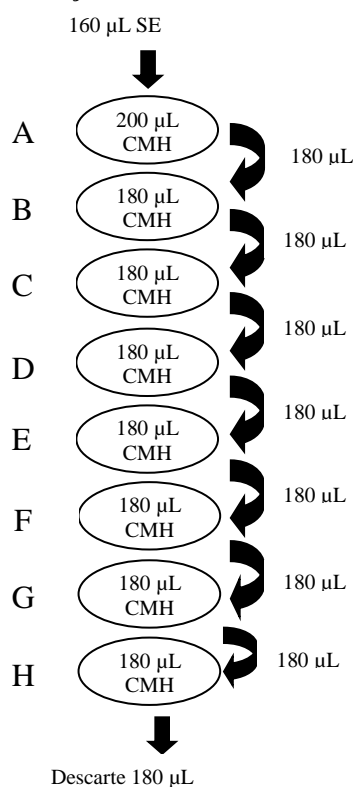


EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; IEM: controle da interferência das amostras sobre o caldo Müller Hinton; ISM: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o caldo Müller Hinton; ISC: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento bacteriano; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Fonte: ADAPTADO DE FERES-NETTO, 2016

A partir das SEs, foram realizadas diluições seriadas diretamente nas microplacas, conforme esquema ilustrativo apresentado pela Figura 22, obtendo-se um gradiente de concentração de 39 a 5000 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos e de 4 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para os ANTs. Inicialmente, foram adicionados 200 μL de caldo Müller Hinton (CMH) (Difco Laboratories[®], Spark, MD, USA) nos poços da fileira A e 180 μL de CMH nos demais poços (fileira B até H). Em seguida, foram acrescidos 160 μL das SEs nos poços da fileira A. Após homogeneização, foram transferidos 180 μL da fileira A para B, e assim sucessivamente até a fileira H. Dos poços da fileira H foram descartados 180 μL , remanescendo igual volume em toda a coluna (180 μL) (Figura 22). Após a realização das diluições seriadas, em quadruplicata, foram adicionados 20 μL da suspensão bacteriana previamente padronizada a ser testada.

Figura 22 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparo da diluição seriada realizada em microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima

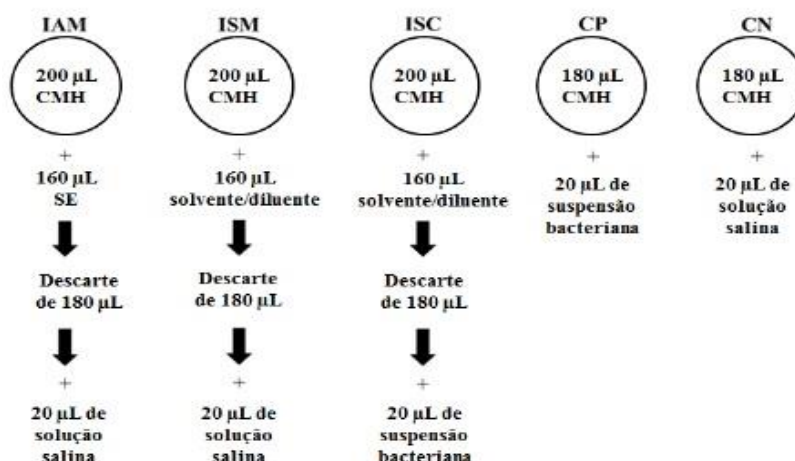


SE: solução estoque dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% obtidos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016; CMH: caldo Müller Hilton.
Fonte: ADAPTADO DE SILVA, 2012

Com o objetivo de garantir a qualidade dos resultados e como parte do processo de validação, foi também preparada uma microplaca contendo os controles para aferição da interferência das amostras (extratos e ANTs) sobre o caldo Müller

Hinton (meio) (IAM) e dos sistemas solvente/diluyente sobre o CMH (meio) (ISM) e sobre o crescimento bacteriano (ISC), além dos controles positivo (CP) e negativo (CN), conforme apresenta a Figura 23.

Figura 23 - Esquema ilustrativo do preparo dos controles utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo realizado em microplaca



IAM: controle da interferência das amostras sobre o caldo Müller Hinton (CMH); ISM: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o CMH; ISC: controle da interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento bacteriano; CN: controle negativo; CP: controle positivo;

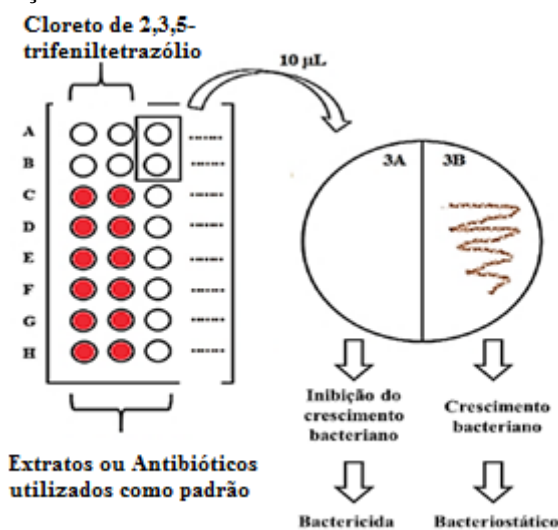
Fonte: ADAPTADO DE SANTANA, 2015

Após incubação a 35 ± 2 °C, em aerobiose, por 16 a 20 horas, realizou-se a leitura das microplacas por meio da adição de 10 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 mg/mL em todos os poços, exceto naqueles da coluna 4, referentes a uma das quadruplicatas dos extratos e ANTs testados, cujos conteúdos foram utilizados para a determinação da CBM e para a classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático. Após a adição do CTT, as microplacas foram incubadas por 30 min nas mesmas condições anteriormente descritas. Após incubação, os poços que apresentaram coloração rosa a avermelhada indicaram crescimento bacteriano e os que mantiveram a cor original foram compatíveis com ausência de crescimento. A CIM foi determinada como "a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo em um teste de susceptibilidade em caldo", conforme conceito descrito no documento M07-A9 (CLSI, 2012).

4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático

A partir dos conteúdos dos poços das colunas das microplacas que não receberam solução de CTT e dos quais não foi observado crescimento bacteriano (colunas 4, 8 e 12 exemplificadas na Figura 21a, pág. 75), foram retirados 10 μ L com auxílio de alça microbiológica calibrada estéril descartável. Estas alíquotas foram estriadas em placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton (AMH) e, após incubação dessas placas em estufa a 35 ± 2 °C, por 18 a 20 horas, em aerobiose, analisou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias. Assim, as concentrações de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 que permitiram o crescimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e aquelas que o inibiram como bactericidas (Figura 24).

Figura 24 - Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima e para classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático



Fonte: ADAPTADO DE SANTANA, 2015

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA *in vivo*

A atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* de extratos aquosos das folhas de *K. brasiliensis* coletadas antes (extrato 1) e durante a floração (extrato 2) foi estudada por Mourão e colaboradores (1999) pelo método de edema de pata induzido por carragenina. O extrato 1 apresentou efeito anti-inflamatório, enquanto o extrato 2 revelou ação pró-inflamatória (MOURÃO et al., 1999). Com o objetivo de melhor

compreender esta propriedade biológica, optou-se pela investigação de EHJ50 e EHJ70, como contraponto de setembro, época de floração desta espécie vegetal (SILVA et al., 2009).

4.8.1 Animais

Os ensaios envolvendo experimentação animal foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF sob responsabilidade do Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa.

Camundongos *Swiss* albinos machos (*Mus musculus*, 45-55 dias e pesando 25 - 30 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da UFJF. Após recebimento, estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas (47 × 34 × 18 cm) (temperatura 24 ± 2 °C e ciclos 12:12 claro/escuro) e receberam água *ad libitum* e alimentação balanceada (Nuvilab Roedores - *Nuvital Nutrients*, Colombo, Brasil). O cuidado e a experimentação animal foram realizados de acordo com as Diretrizes para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório em Pesquisa Biomédica do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (protocolo número 005/2016) (ANEXO A).

4.8.2 Método de edema de orelha induzido por óleo de Cróton

O edema de orelha induzido por óleo de Cróton em camundongos foi realizado como descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982), com pequenas modificações. Esta indução foi promovida em grupos com seis camundongos cada (n = 6) usando 20 µL de óleo de Cróton 2,5% (v/v, diluído em acetona) na superfície interna da orelha direita. Foi determinada uma linha de base na orelha esquerda por meio da aplicação de 20 µL de acetona (veículo) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após 60 min, o tratamento com EHJ50 e EHJ70 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, solubilizados em água destilada) e dexametasona (Singularis Farmácia de Manipulação Ltda, São João Nepomuceno, MG, Brasil) (0,1 mg/orelha, controle positivo) foi realizado na orelha direita, enquanto o controle negativo (não tratado) recebeu 20 µL de acetona. Para acompanhar a evolução da resposta anti-inflamatória dos extratos, a espessura da orelha (mm) foi medida após 6 e 24 horas, enquanto o peso foi quantificado após eutanásia usando fragmentos de orelha (discos de 6 mm). Uma parte

dos fragmentos foi conservada em formaldeído 10% (v/v) para as análises histopatológicas e a outra foi utilizada para determinar os marcadores inflamatórios (mieloperoxidase, N-acetil- β -D-glicosaminidase, NO, IL-6 e TNF- α).

4.8.3 Método do edema de orelha induzido por fenol

Com base na descrição de Lim, Park e Kim (2004), com pequenas modificações, o fenol (10% v/v em 20 μ L de acetona) foi aplicado topicamente na superfície interna da orelha direita, induzindo o edema dessa região em camundongos (n = 6), enquanto 20 μ L de acetona (veículo; controle negativo) foram administrados na orelha esquerda. Após 15 min, o tratamento tópico foi realizado com EHJ50 e EHJ70 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, solubilizada em água destilada) e dexametasona (0,1 mg/orelha em 20 μ L de acetona; controle positivo). O edema da orelha foi avaliado 2 horas após a aplicação do fenol por meio do aumento da espessura e peso da orelha.

4.8.4 Método do edema de orelha induzido por histamina

O efeito dos extratos EHJ50 e EHJ70 sobre a reação de hipersensibilidade de tipo imediato foi avaliado utilizando o modelo de edema de orelha induzido por histamina. Para iniciar este procedimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e, então, a espessura da orelha foi medida no tempo zero (t_0) (medida basal). Doses de EHJ50 e EHJ70 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha em água destilada) e dexametasona (0,1 mg/orelha em 20 μ L de acetona) foram aplicadas topicamente na região dorsal da orelha direita (BRAND et al., 2002). O grupo controle negativo recebeu 20 μ L de solução salina. Após 30 min de tratamento, foram administrados, por via intradérmica, 5 μ L de histamina (100 mg/mL em solução salina) na região ventral da orelha direita. Noventa minutos após a aplicação de histamina, a espessura da orelha foi medida novamente. A diferença entre as medições da espessura da orelha nos tempos zero e 90 min foi considerada como o valor de edema avaliado neste ensaio. Além disso, foram realizadas medições dos pesos das orelhas.

4.8.5 Avaliação do edema de orelha

Para todos os modelos utilizados neste estudo, cada animal foi eutanasiado com uma sobredosagem de cetamina (240 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg), a espessura (μM) foi medida próxima à extremidade medial da orelha com o auxílio de um micrômetro externo digital (DIGIMESS[®], IP40) e um disco (6 mm de diâmetro) das orelhas direita e esquerda foi removido com a ajuda de um *punch* metálico (Richter). Esses fragmentos foram pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu) e a diferença de peso (mg) entre as orelhas direita e esquerda (não inflamada) foi a medida do edema.

4.8.6 Análise histopatológica

As amostras de tecido das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm) do modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton foram conservadas em formol 10%. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas e conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Em seguida, o material foi desidratado, emblocado em parafina, seccionado em cortes de 5 μm em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos e vasodilatação foram os parâmetros da inflamação avaliados em áreas representativas com aumento de 100x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio acoplado à câmera fotográfica digital (Olympus[®], BX-41) (CHIBLI et al., 2014).

4.8.7 Determinação da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade enzimática da MPO, um indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos, foi realizada pelo método descrito por Bradley e colaboradores (1982), modificado por De Young e colaboradores (1989). A fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton foram adicionados 750 μL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e, após, procedeu-se à trituração por cerca de 45 s a 0 °C. O homogenato obtido foi decantado em microtubos e a ele foram

adicionados 750 μL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubos e centrifugada a 12000 x g a 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi coletado, armazenado em microtubos e determinou-se a concentração de proteínas por meio do método de Lowry (1951). Este ensaio foi realizado em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço da microplaca foram adicionados 25 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), cuja concentração final foi de 1,6 mM em DMSO, 100 μL de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,003% v/v em tampão fosfato de sódio pH 5,4 e 25 μL do homogenato. Após preparada, a microplaca foi incubada a 37 °C por 5 min. Em seguida, a cada poço foram adicionados 100 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 4 M a 4 °C, interrompendo a reação. As medidas das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (Thermoplate[®], TP-Reader) em 450 nm e os resultados expressos em mDO/mg de proteína.

4.8.8 Determinação da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG)

A NAG, enzima usada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido, foi avaliada segundo Sanchez e Moreno (1999). Para tanto, aos fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton foram adicionados 750 μL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de HTBA e, em seguida, procedeu-se à trituração por cerca de 45 s a 0 °C. O homogenato obtido foi decantado em microtubos e a ele foram adicionados 750 μL do tampão anteriormente utilizado. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubos e centrifugada a 12000 x g a 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi coletado, armazenado em microtubos e determinou-se a concentração de proteínas por meio do método de Lowry (1951). A determinação de NAG foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. A cada poço da microplaca foram adicionados 100 μL do homogenato e 100 μL de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5). A microplaca preparada foi incubada durante 10 min a 37 °C, sendo a reação interrompida pela adição de 100 μL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). As medidas das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (Thermoplate[®], TP-Reader) em 405 nm e os resultados expressos em mDO/mg de proteína.

4.8.9 Determinação da produção do óxido nítrico (NO)

A concentração de NO foi analisada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito (NO_2^-) pelo método colorimétrico de Griess (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess consiste de uma mistura 1:1 de solução de sulfanilamida a 1% (m/v) e solução de α -naftil-etilenodiamina a 0,1% (m/v), ambas em ácido fosfórico a 5%. O homogenato foi preparado com os fragmentos de orelhas obtidos no modelo de edema induzido por óleo de Cróton pela adição de 3000 μL de salina tamponada (PBS, pH 7,2) e trituração por cerca de 60 s. O homogenato foi coletado e armazenado em microtubos a 80 °C negativos. A concentração de nitrito foi determinada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 μL do homogenato e 100 μL do reagente de Griess. A microplaca preparada foi incubada durante 20 min em temperatura ambiente. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (Thermoplate[®], TP-Reader) em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva de calibração construída utilizando uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) nas concentrações de 200 a 3,12 μM . As absorvâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva padrão e os resultados obtidos expressos em μM .

4.8.10 Determinação da produção de citocinas

A dosagem das citocinas foi realizada pelo método de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou ensaio imunoenzimático usando *kits* comerciais (PeProtech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As concentrações de TNF- α e IL-6 foram medidas no homogenato preparado com os fragmentos de orelhas obtidos no modelo de edema induzido por óleo de Cróton. Após 24 horas de incubação do homogenato (recomendação do fabricante), 100 μL de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MI, USA) dissolvidos em tampão citrato (0,05 M, pH 4,0, com 0,01% H_2O_2) foram aplicados para visualização da ligação com anticorpo. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (Thermoplate[®], TP-Reader) em 405 nm. Os níveis de sensibilidade para os *kits* de TNF- α e IL-6 foram de 16 pg/mL (de acordo com as especificações do fabricante).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou erro padrão médio (E.P.M.) A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Tukey ou Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes foi de $p < 0,001$. Todos os testes foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism[®]5 (San Diego, CA, Estados Unidos da América).

5. RESULTADOS

5.1 MASSAS E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

A Tabela 6 apresenta os resultados das massas (g) e rendimentos (%) obtidos com EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70. Pela análise desta Tabela, observa-se que, a partir de 300 g das folhas de *K. brasiliensis* coletadas nos meses de janeiro e setembro de 2016, EHJ50 e EHJ70 apresentaram os maiores rendimentos (4,14% e 4,11%, nessa ordem), enquanto EHS30 revelou o menor percentual (3,04%).

Tabela 6 - Resultados das massas e dos rendimentos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016

Mês / Ano	Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Janeiro / 2016	EHJ30	10,32	3,44
	EHJ50	12,43	4,14
	EHJ70	12,34	4,11
Setembro / 2016	EHS30	9,11	3,04
	EHS50	10,21	3,40
	EHS70	10,81	3,60

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

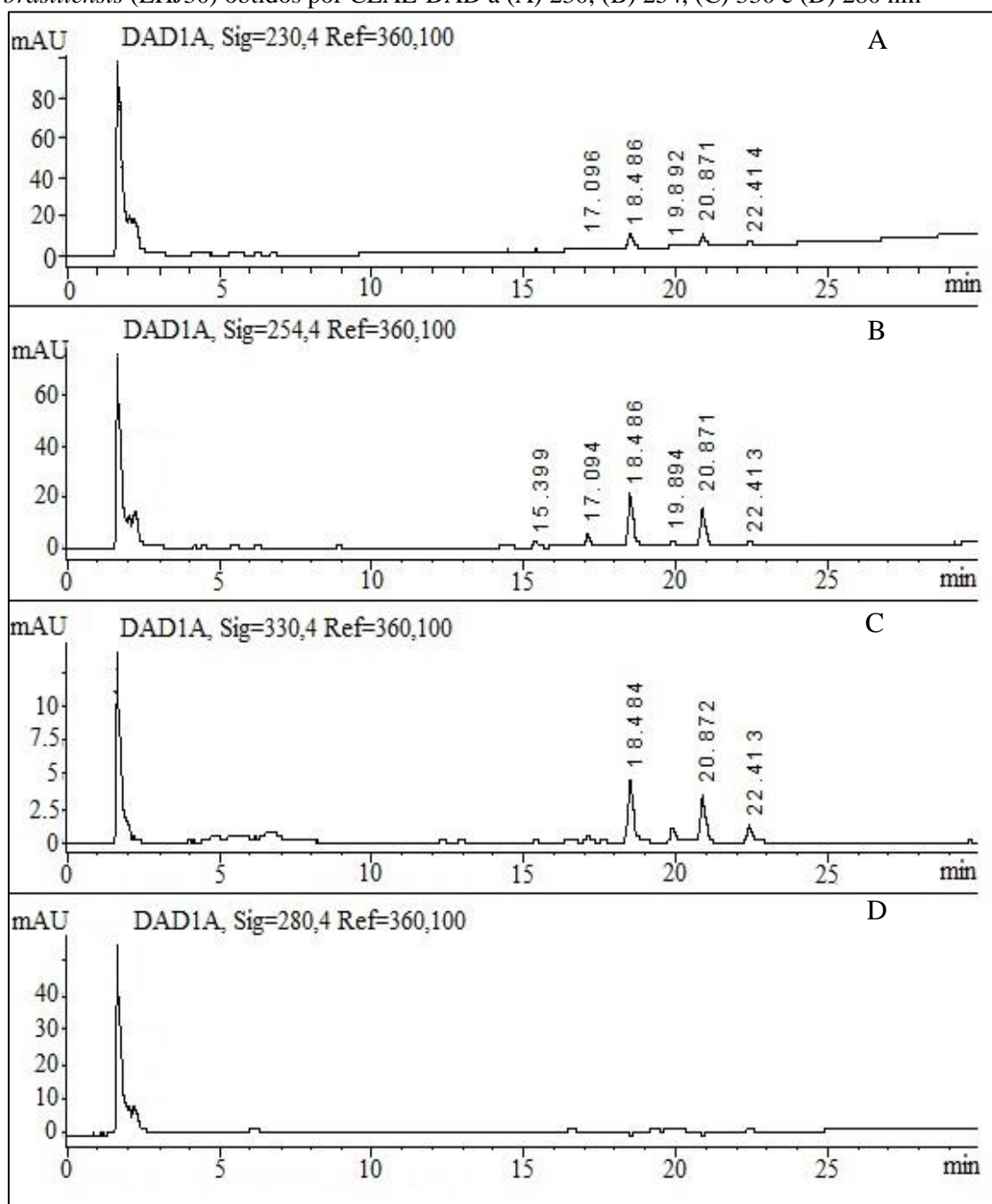
5.2 INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

No presente estudo, EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foram submetidos à análise por CLAE-DAD nos comprimentos de onda de 230, 254, 280 e 330 nm para investigação de suas composições químicas.

5.2.1 Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016

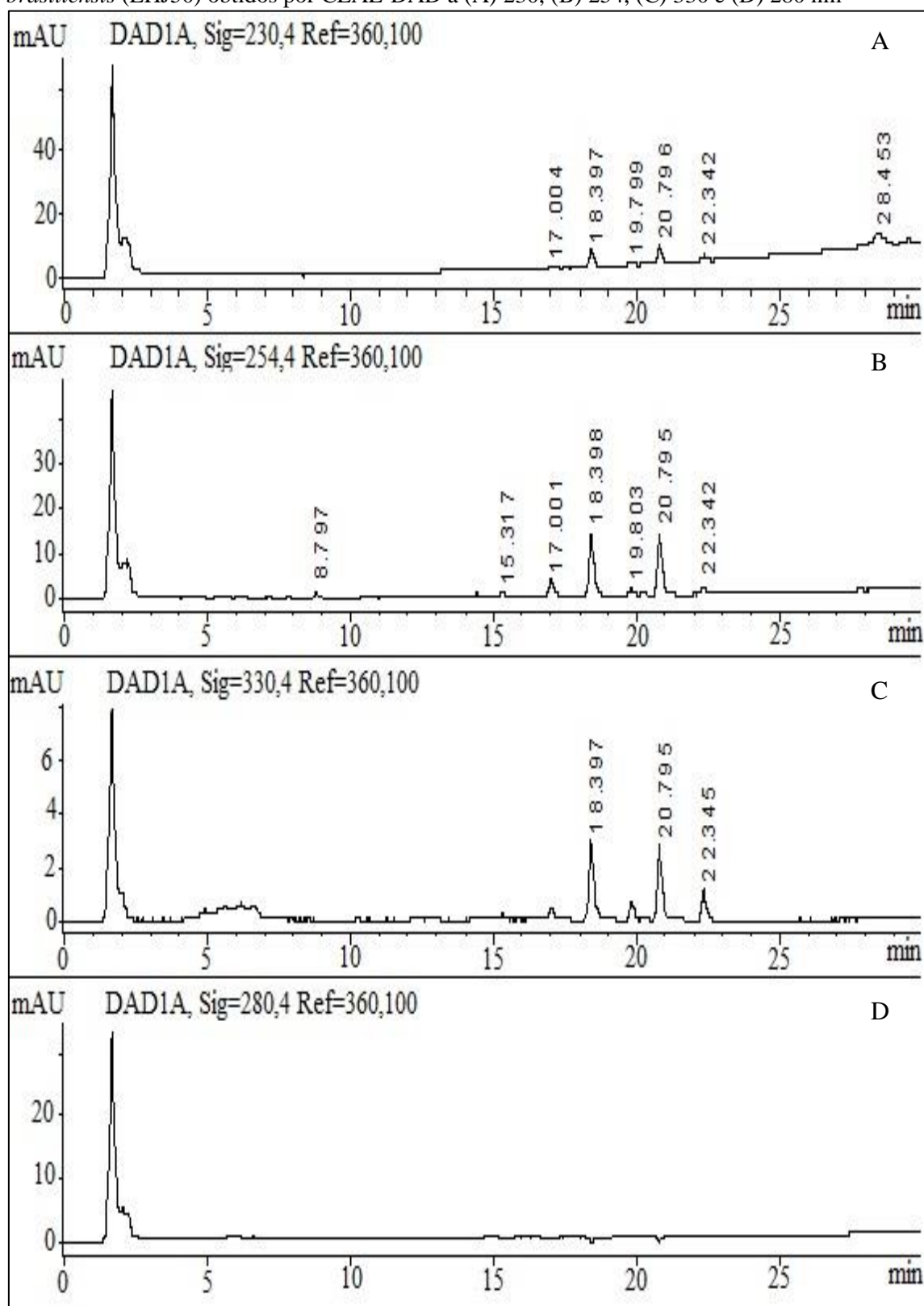
As Figuras 25, 26 e 27 apresentam os perfis cromatográficos de EHJ30, EHJ50 e EHJ70, respectivamente, obtidos nos comprimentos de onda (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm.

Figura 25 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 30% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ30) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm



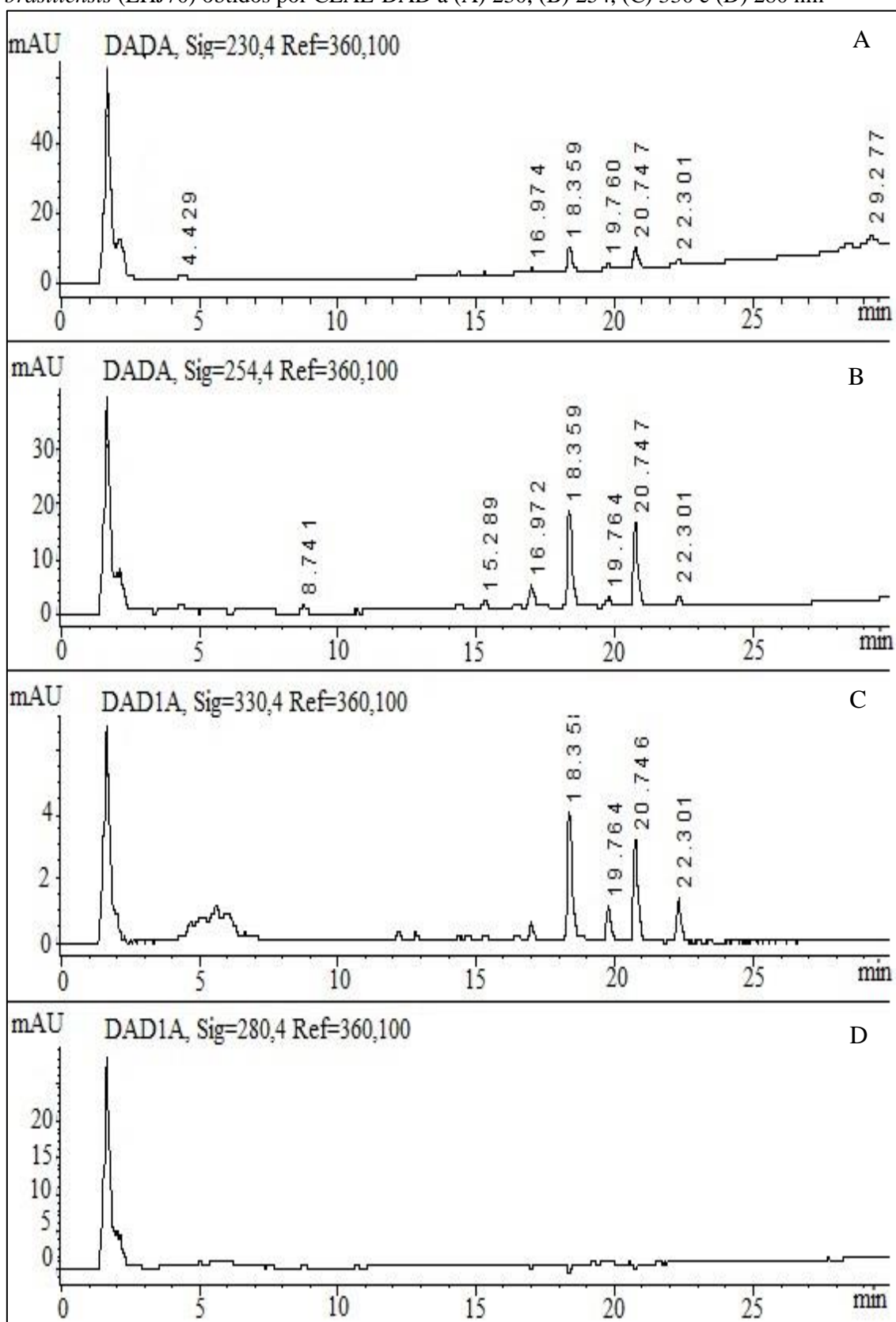
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 26 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 50% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ50) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

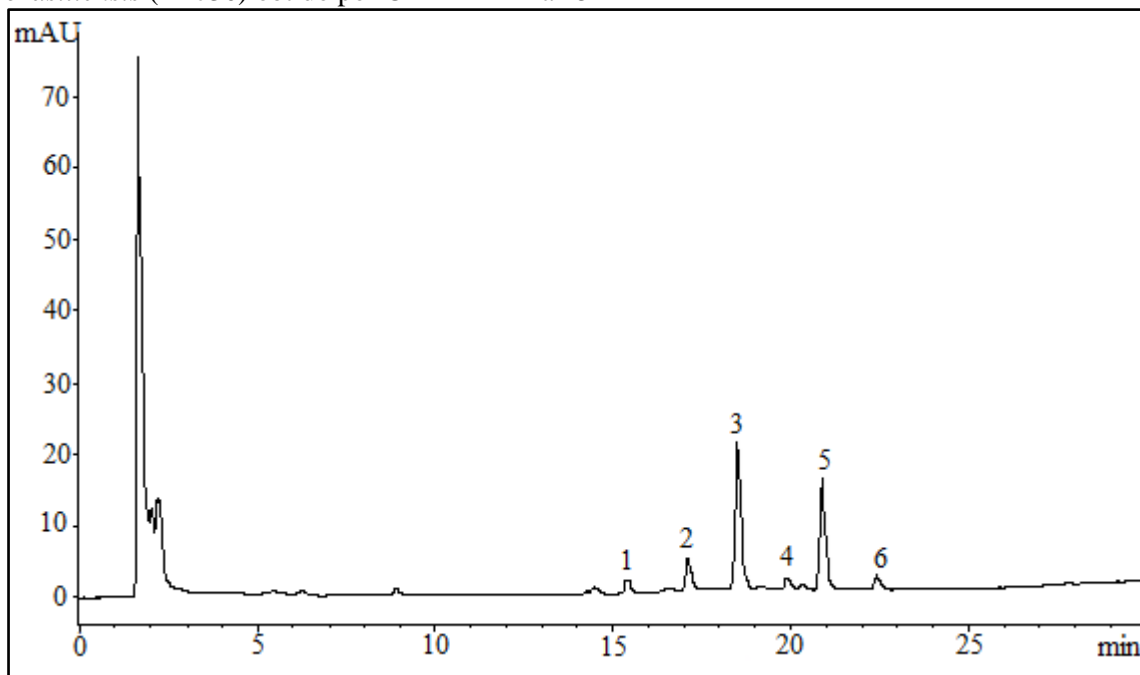
Figura 27 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 70% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ70) obtidos por CLAE-DAD a (A) 230, (B) 254, (C) 330 e (D) 280 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

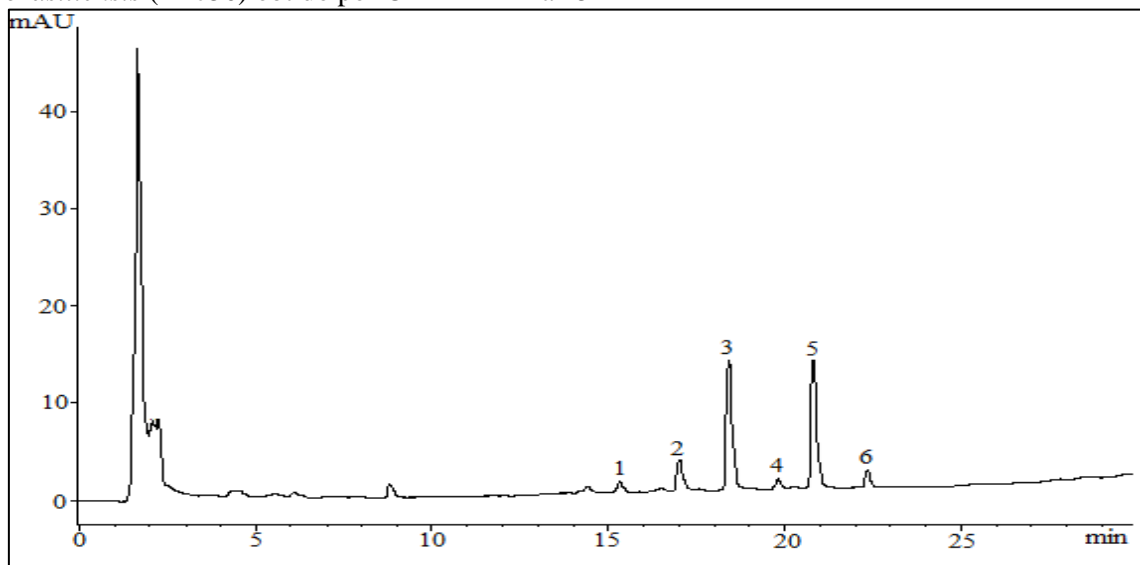
Após apreciação das resoluções dos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 25, 26 e 27 (A), (B), (C) e (D), optou-se pela ampliação daqueles obtidos a 254 nm, em virtude da melhor visualização dos picos detectados. Assim, foi possível observar a presença de seis picos principais em EHJ30 (Figura 28), EHJ50 (Figura 29) e EHJ70 (Figura 30), com tempos de retenção (t_r) similares entre si.

Figura 28 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 30% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ30) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



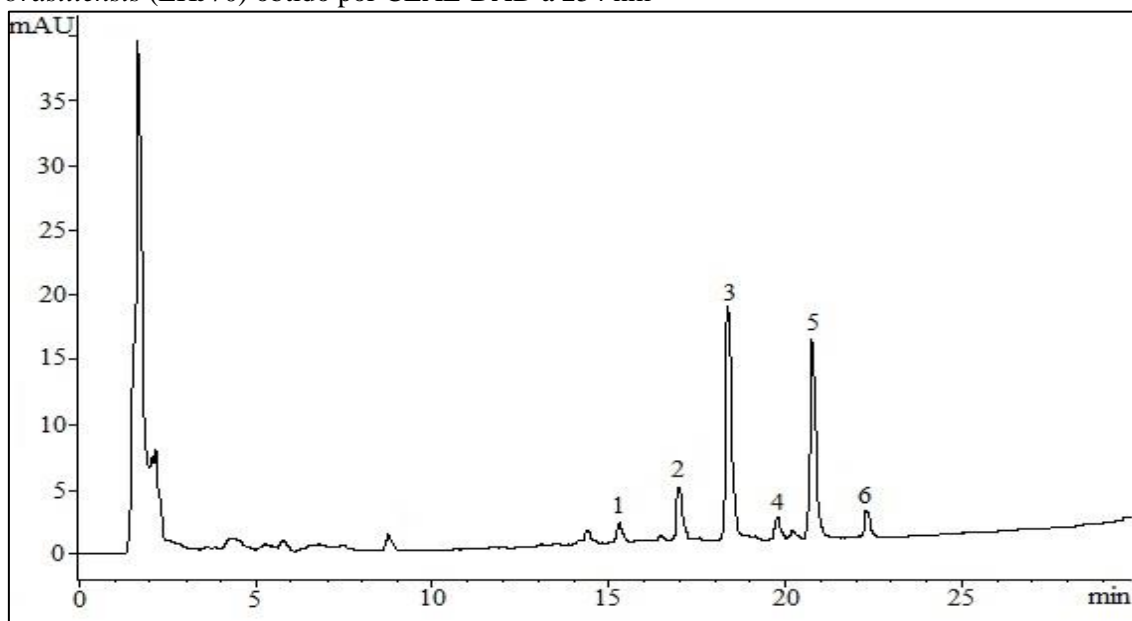
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 29 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 50% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ50) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

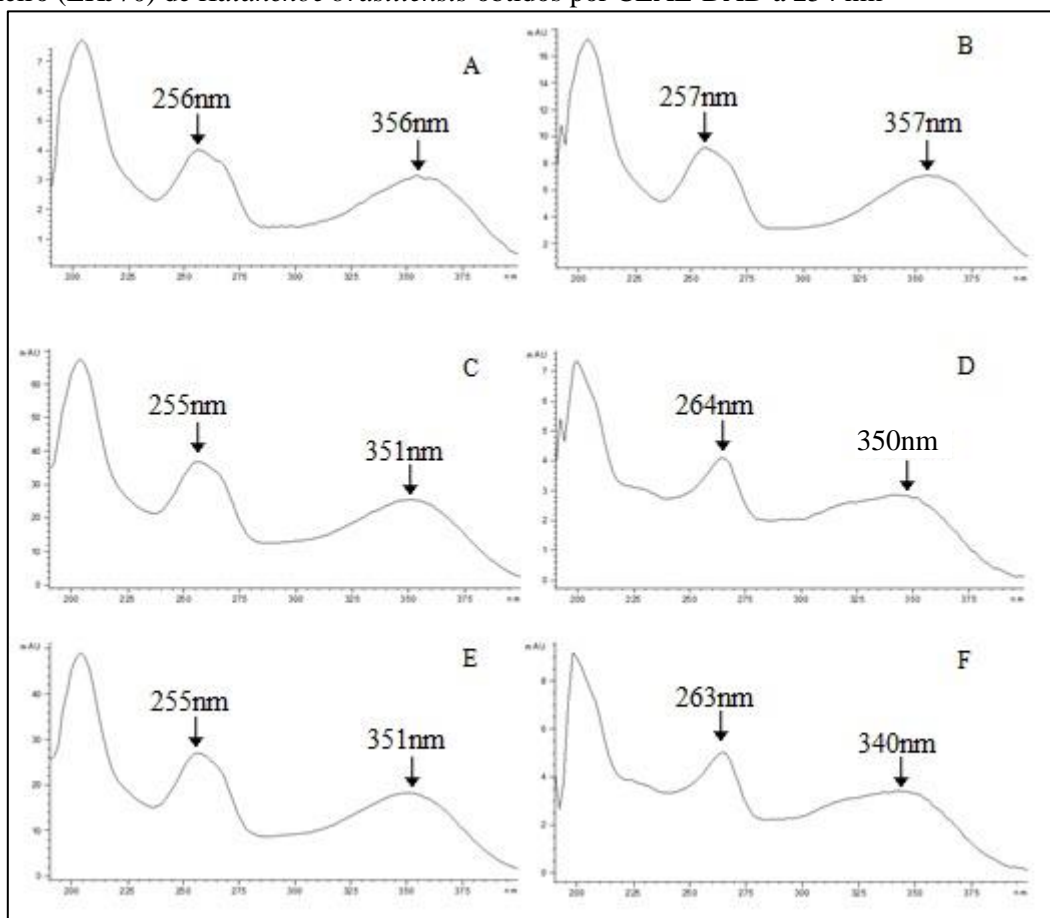
Figura 30 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 70% janeiro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHJ70) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Na Figura 31, observam-se os espectros de absorção na região do UV correspondentes aos seis picos detectados nos perfis cromatográficos de EHJ30, EHJ50 e EHJ70 obtidos por CLAE-DAD a 254 nm (Figuras 28, 29 e 30, respectivamente), sugestivos de flavonoides, especificamente das classes flavonois e flavonas. De acordo com a revisão da literatura, espectros típicos destas substâncias apresentam bandas de absorção nas faixas de comprimento de onda de 300 a 385 nm e de 250 a 295 nm (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Figura 31 - Espectros de absorção na região do UV dos picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30% janeiro (EHJ30), 50% janeiro (EHJ50) e 70% janeiro (EHJ70) de *Kalanchoe brasiliensis* obtidos por CLAE-DAD a 254 nm



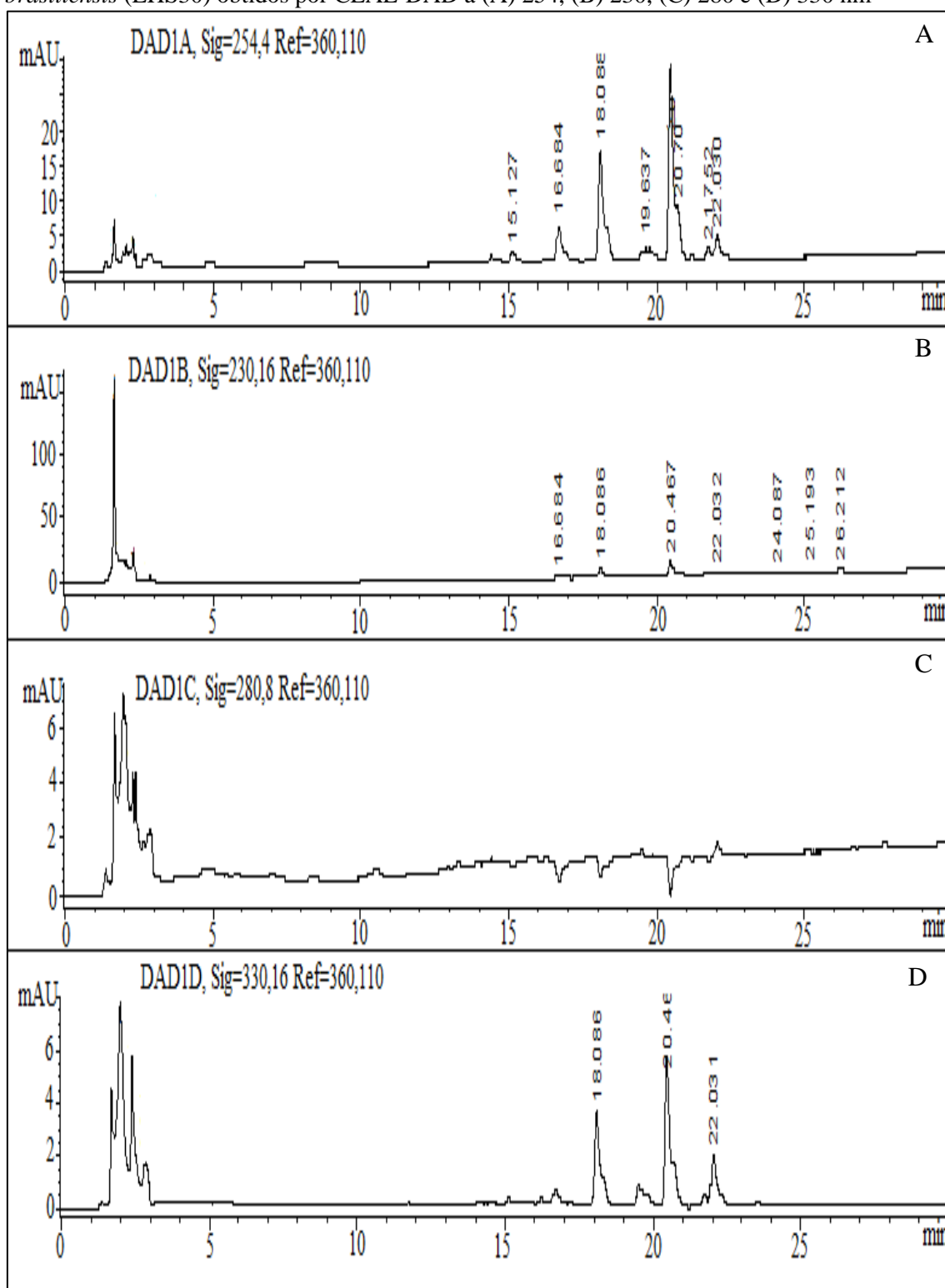
A: espectro UV correspondente ao pico 1; B: espectro UV correspondente ao pico 2; C: espectro UV correspondente ao pico 3; D: espectro UV correspondente ao pico 4; E: espectro UV correspondente ao pico 5; F: espectro UV correspondente ao pico 6.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.2.2 Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em setembro de 2016

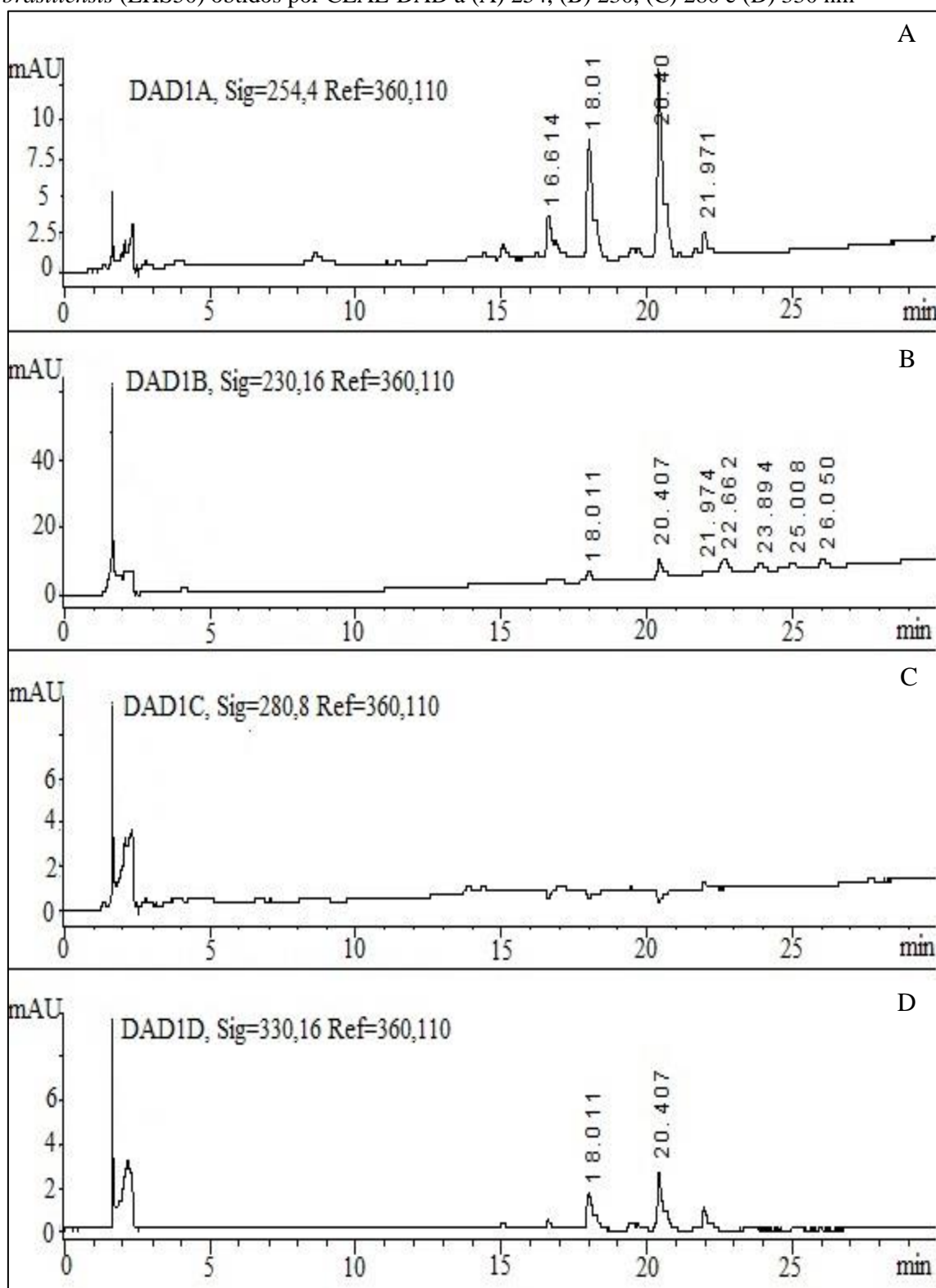
As Figuras 32, 33 e 34 apresentam os perfis cromatográficos de EHS30, EHS50 e EHS70, respectivamente, obtidos nos comprimentos de onda (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm.

Figura 32 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 30% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS30) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm



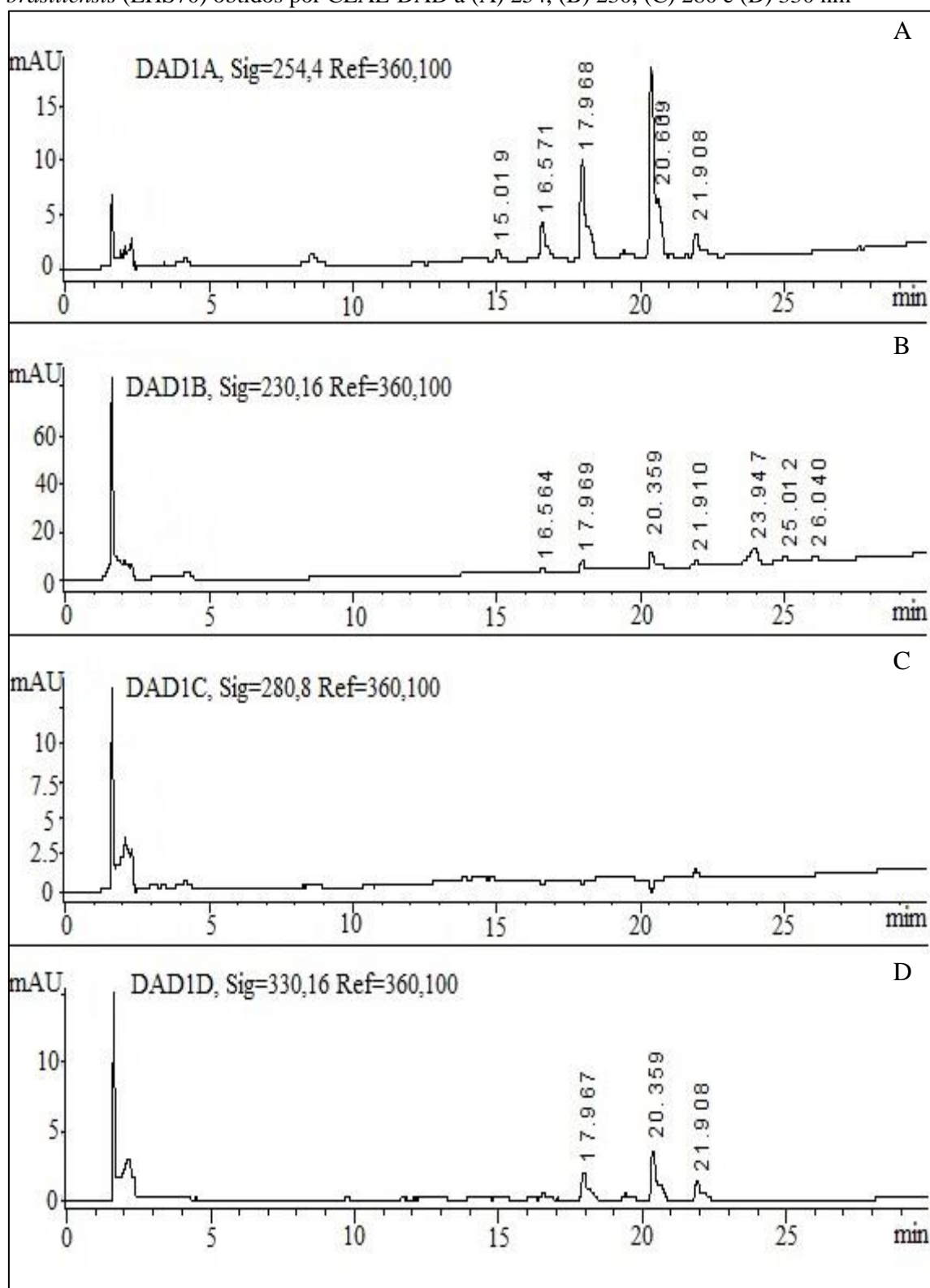
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 33 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 50% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS50) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

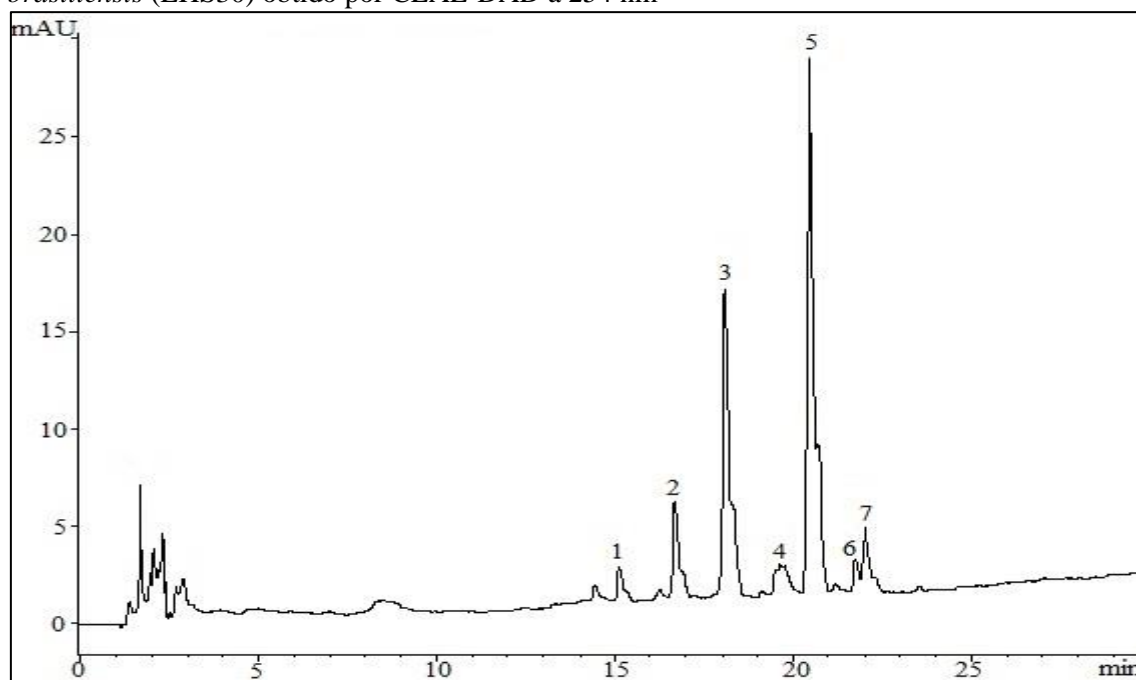
Figura 34 - Perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico 70% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS70) obtidos por CLAE-DAD a (A) 254, (B) 230, (C) 280 e (D) 330 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

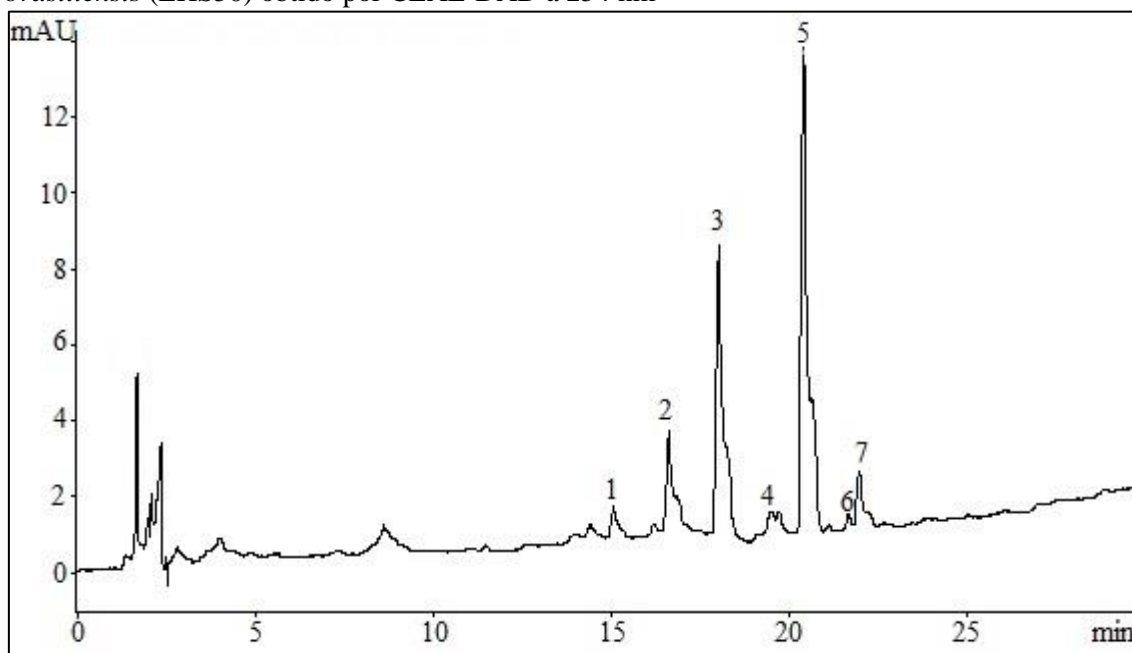
Após apreciação das resoluções dos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 32, 33 e 34 (A), (B), (C) e (D), optou-se pela ampliação daqueles obtidos a 254 nm, em virtude da melhor visualização dos picos detectados. Assim, foi possível observar a presença de sete picos principais em EHS30 (Figura 35) e EHS50 (Figura 36) e seis em EHS70 (Figura 37), com t_r s similares entre si, conforme apresenta a Tabela 7.

Figura 35 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 30% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS30) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



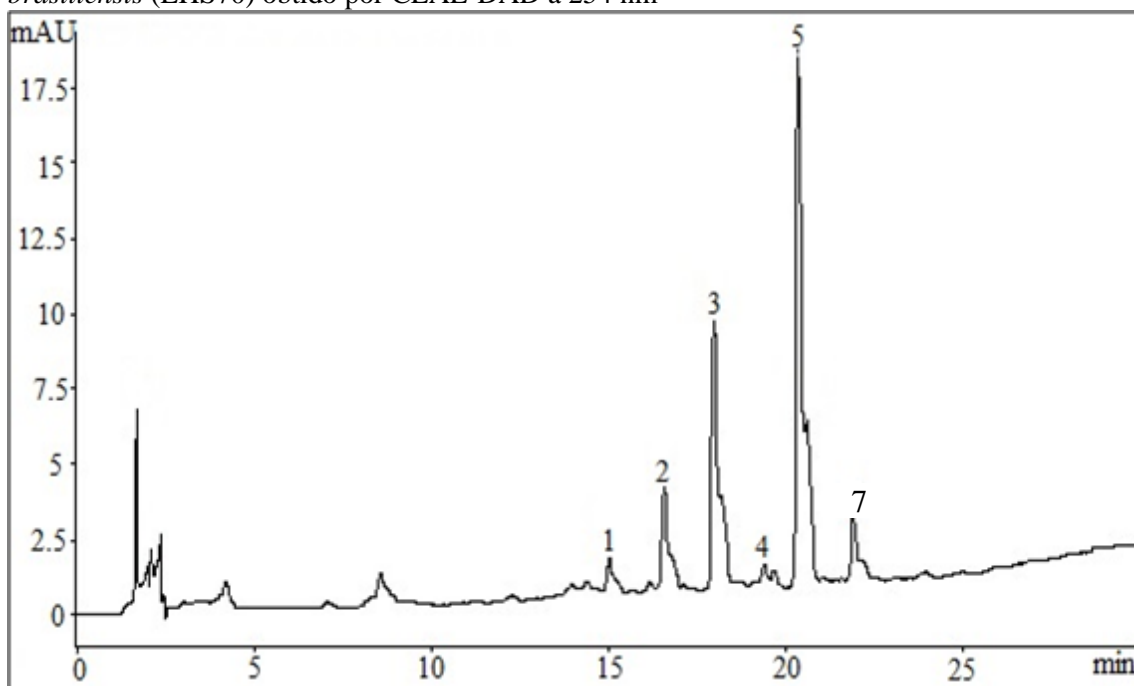
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 36 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 50% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS50) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Figura 37 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico 70% setembro de *Kalanchoe brasiliensis* (EHS70) obtido por CLAE-DAD a 254 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A análise das Figuras 35, 36 e 37 permite observar uma discreta alteração nos perfis cromatográficos e nos t_r dos extratos investigados, sendo possível a percepção de dois sinais no pico 4 em EHS30, EHS50 e EHS70, compatível com a presença de duas substâncias, e a não detecção do pico 6 em EHS70.

A Tabela 7 apresenta um resumo dos t_r dos principais picos detectados em EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 por meio de CLAE-DAD a 254 nm. Conforme mostra esta Tabela, os valores dos t_r obtidos foram muito similares entre si. Apesar dos perfis cromatográficos de EHS50 e EHS70 permitirem a detecção dos picos 1, 4 e 6, e 4 (Figuras 36 e 37), nessa ordem, não foi possível determinar seus t_r visto que o sinal foi muito baixo, sendo incapaz de ser captado pelo detector.

Tabela 7 - Valores dos tempos de retenção dos principais picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 e obtidos por CLAE-DAD a 254 nm

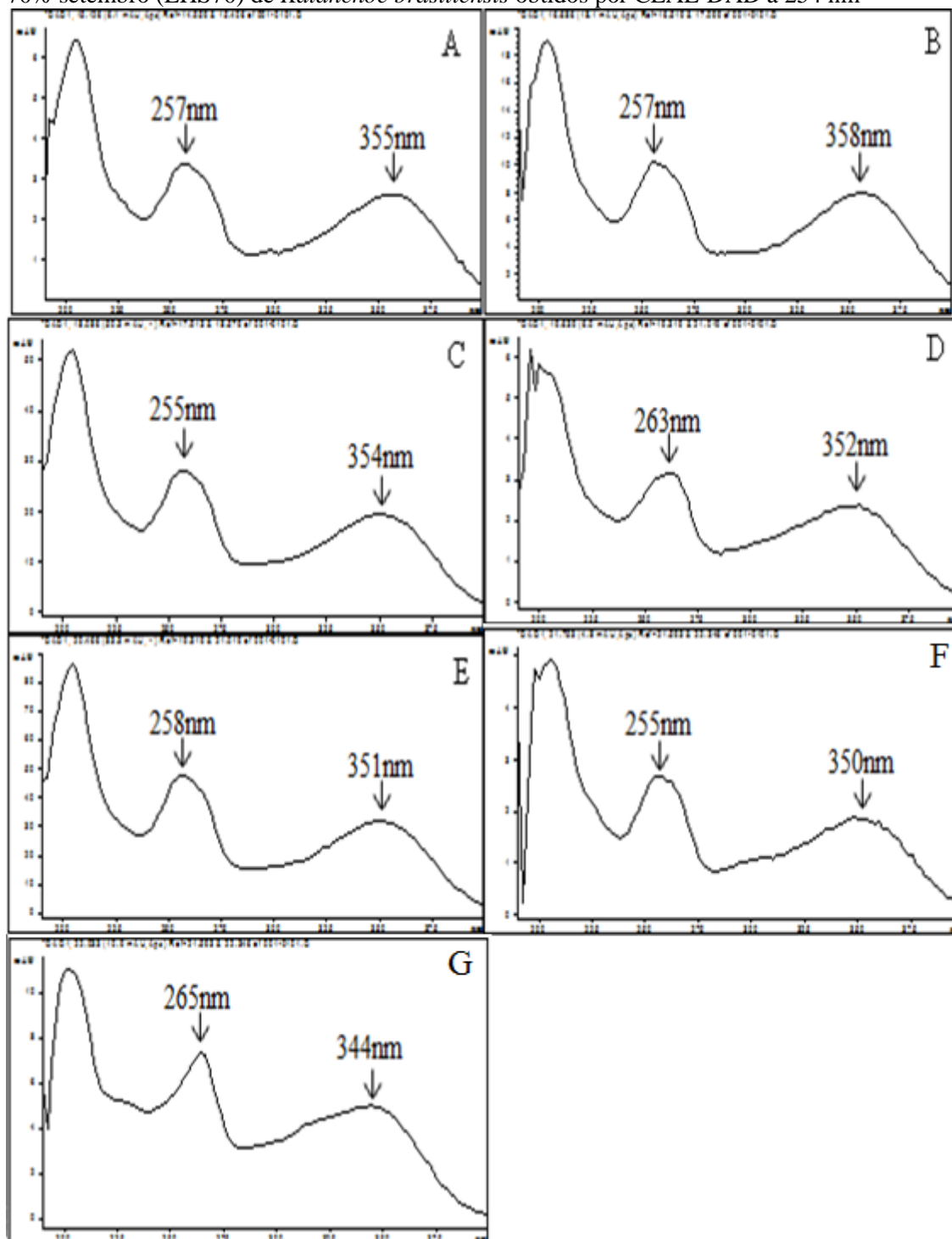
Pico	Tempo de Retenção (minutos)					
	EHJ30	EHJ50	EHJ70	EHS30	EHS50	EHS70
1	15,399	15,317	15,289	15,127	ND	15,019
2	17,094	17,001	16,972	16,684	16,614	16,571
3	18,486	18,398	18,359	18,088	18,012	17,968
4	19,894	19,803	19,764	19,637	ND	ND
5	20,871	20,795	20,747	20,460	20,400	20,350
6	22,413	22,342	22,301	21,752	ND	21,908
7	NE	NE	NE	22,030	21,971	NE

ND: Não determinado; NE: Não detectado; EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Na Figura 38, observam-se os espectros de absorção na região do UV correspondentes aos sete picos detectados nos perfis cromatográficos de EHS30 e EHS50 e aos seis de EHS70 obtidos por CLAE-DAD a 254 nm, sugestivos de flavonoides, especificamente de flavonois e flavona. De acordo com a revisão da literatura, espectros típicos destas substâncias apresentam bandas de absorção nas faixas de comprimento de onda de 300 a 385 nm e de 250 a 295 nm (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Figura 38 - Espectros de absorção na região do UV dos picos detectados nos perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos 30% setembro (EHS30), 50% setembro (EHS50) e 70% setembro (EHS70) de *Kalanchoe brasiliensis* obtidos por CLAE-DAD a 254 nm



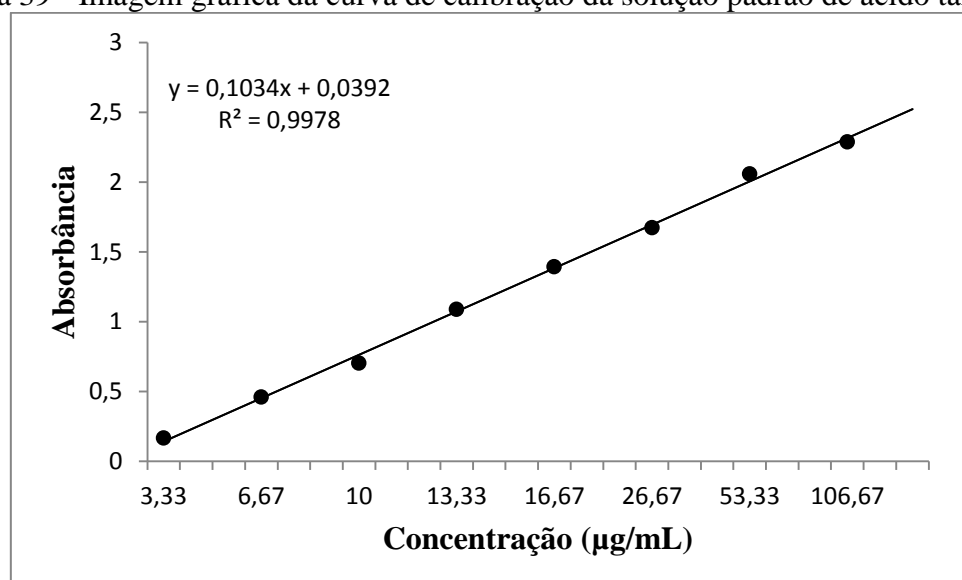
A: espectro UV correspondente ao pico 1; B: espectro UV correspondente ao pico 2; C: espectro UV correspondente ao pico 3; D: espectro UV correspondente ao pico 4; E: espectro UV correspondente ao pico 5; F: espectro UV correspondente ao pico 6; G: espectro UV correspondente ao pico 7.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi realizada utilizando a curva de calibração do ácido tânico (Figura 39). A equação da reta foi obtida após análise de regressão linear ($y = 0,1034x + 0,0392$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9978$). Nesta equação, os valores de "y" foram substituídos pelas absorvâncias dos extratos e os valores de "x" corresponderam às concentrações de fenóis totais nos extratos analisados. Considerados os fatores de diluição empregados, as concentrações foram ajustadas para teores de fenóis totais, expressos em mg de fenóis/g de extrato equivalente a ácido tânico (EAT).

Figura 39 - Imagem gráfica da curva de calibração da solução padrão de ácido tânico



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Tabela 8 apresenta os resultados dos teores de fenóis totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em EAT. Conforme se observa pela análise desta Tabela, estes valores variaram de 25,47 a 30,11 mg/g EAT, sendo que o maior teor foi observado para EHJ70 (30,11 mg de fenóis/g de EHJ70 EAT), enquanto o menor para EHS30 (25,47 mg de fenóis/g de EHS30 EAT). Observa-se, ainda, que com exceção de EHS70, os extratos hidroetanólicos janeiro apresentaram teores de fenóis totais discretamente maiores que aqueles de setembro.

Tabela 8 - Resultados dos teores de fenóis totais de EHI30, EHI50, EHI70, EHS30, EHS50 e EHS70 em equivalente a ácido tânico (EAT)

Extrato	mg de fenóis/g de extrato EAT
EHI30	26,66 ± 0,27
EHI50	28,16 ± 0,07
EHI70	30,11 ± 0,27
EHS30	25,47 ± 0,24
EHS50	26,17 ± 0,02
EHS70	27,06 ± 0,10

EHI30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHI50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHI70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

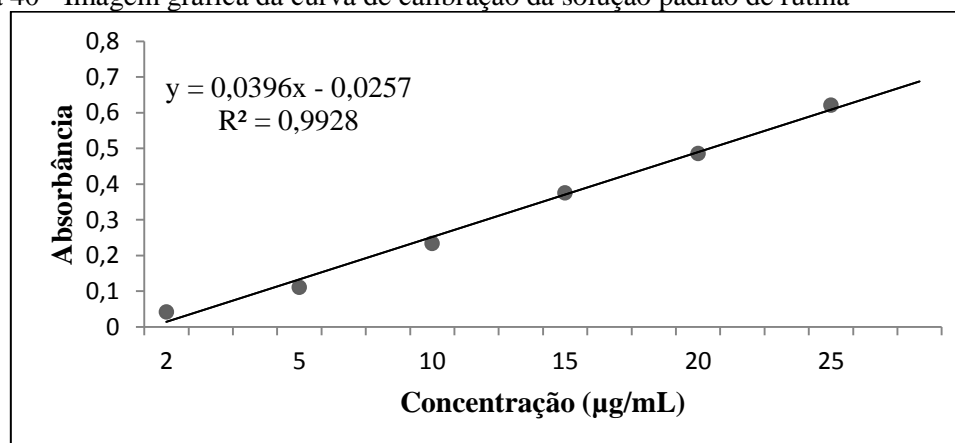
Os valores correspondem à média ± desvio padrão. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais de EHI30, EHI50, EHI70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi realizada utilizando a curva de calibração da rutina (Figura 40). A equação da reta foi obtida após análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = 0,0396x - 0,0257$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9928$). A concentração foi ajustada em teor de flavonoides totais equivalentes a rutina (ER).

Figura 40 - Imagem gráfica da curva de calibração da solução padrão de rutina



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Tabela 9 apresenta os resultados dos teores de flavonoides totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em ER. Pela análise desta Tabela, observa-se que estes valores variaram de 11,84 a 16,95 mg/g de extrato ER, sendo que o maior teor foi observado para EHJ70 (16,95 mg de flavonoides/g de EHJ70 ER), enquanto o menor para EHS30 (11,84 mg de flavonoides/g de EHS30 ER). Observa-se, ainda, que os extratos hidroetanólicos janeiro apresentaram teores de flavonoides totais maiores que aqueles de setembro.

Tabela 9 - Resultados dos teores de flavonoides totais de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em equivalente a rutina (ER)

Extrato	mg de flavonoides/g de extrato ER
EHJ30	16,59 ± 0,17
EHJ50	15,43 ± 0,19
EHJ70	16,95 ± 0,05
EHS30	11,84 ± 0,00
EHS50	12,49 ± 0,10
EHS70	13,33 ± 0,05

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Os valores correspondem à média ± desvio padrão. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

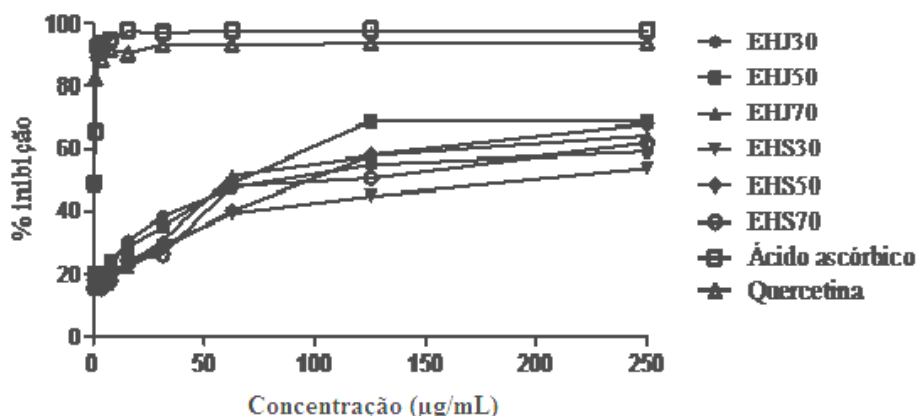
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

5.5.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)

A atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi inicialmente avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH•. Conforme mostram a Figura 41 e a Tabela 10, EHJ50 apresentou maior porcentagem de inibição (%I), com valor igual a 69,13%, enquanto EHS30 revelou a menor %I, equivalente a 53,85%.

Figura 41 - Porcentagens de inibição (%I) dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016, ácido ascórbico e quercetina



EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Os valores correspondem à média E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Tabela 10 apresenta, ainda, os resultados da CE_{50} de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70. De acordo com os dados desta Tabela, os valores de CE_{50} variaram de $58,08 \pm 15,87$ (EHJ50) a $257,70 \pm 79,47$ µg/mL (EHS30) e não foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$).

Tabela 10 - Resultados da porcentagem de inibição (%I) e da CE_{50} dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 obtidos pelo método do sequestro do radical DPPH•

Extrato / Substância Padrão	%I	CE_{50} (µg/mL)
EHJ30	59,11	$96,18 \pm 15,03$
EHJ50	69,13	$58,08 \pm 15,87$
EHJ70	64,36	$86,71 \pm 22,28$
EHS30	53,85	$257,70 \pm 79,47$
EHS50	68,01	$100,10 \pm 29,60$
EHS70	62,03	$120,04 \pm 32,53$
Ácido ascórbico	98,00	$0,52 \pm 0,04$
Quercetina	93,91	$0,40 \pm 0,10$

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias das amostras não diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.5.2 Método de redução da complexação do fosfomolibdênio

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi também investigada pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio. Conforme mostra a Tabela 11, pode-se observar que EHJ50 e EHJ70 apresentaram os maiores valores de AAR% ($16,730 \pm 0,342$ e $16,780 \pm 0,239$, respectivamente) quando comparados aos demais extratos.

Tabela 11 - Resultados dos valores da Atividade Antioxidante Relativa (AAR%) dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 obtidos pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio

Extrato	AAR% (ácido ascórbico)
EHJ30	$10,080 \pm 0,232$
EHJ50	$16,730 \pm 0,342$
EHJ70	$16,780 \pm 0,239$
EHS30	$8,491 \pm 0,233$
EHS50	$13,040 \pm 0,364$
EHS70	$12,810 \pm 0,353$

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

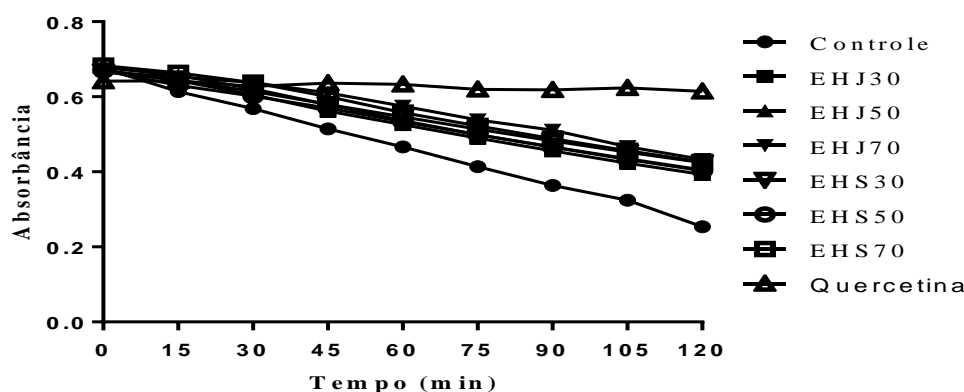
Os valores correspondem à média E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$ com exceção de EHJ50 e EHJ70, que não diferem entre si.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.5.3 Método da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante *in vitro* foi ainda investigada pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Pela análise da Figura 42, observa-se o decaimento das absorbâncias obtidas com EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 em relação ao tempo (min) em decorrência da oxidação do β -caroteno. Desta forma, quanto menor o decaimento, maior a %I. Entre os extratos investigados por este método, EHJ70 demonstrou menor decaimento e, conseqüentemente, maior %I (Figura 42). Considerando a %I, os resultados obtidos com EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50, EHS70 e quercetina variaram de $37,51 \pm 0,47\%$ a $92,33 \pm 0,67\%$, sendo que EHJ70 mostrou-se o extrato mais eficiente, com $44,46 \pm 0,84\%$ (Tabela 12).

Figura 42 - Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico obtido com os extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 e com quercetina



E H J 30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; E H J 50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; E H J 70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; E H S 30: extrato hidroetanólico 30% setembro; E H S 50: extrato hidroetanólico 50% setembro; E H S 70: extrato hidroetanólico 70% setembro.

Os valores correspondem à média E.P.M. As médias diferem em relação ao controle após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

A Figura 42 também permitiu o cálculo dos valores de F1 e F2, fornecendo dados adicionais sobre a atividade antioxidante *in vitro*. E H J 70 mostrou os valores mais baixos entre os extratos avaliados, com F1 de $0,43 \pm 0,04$ e F2 de $0,57 \pm 0,04$. A quercetina (controle positivo) apresentou valores iguais a $0,12 \pm 0,01$ e $0,53 \pm 0,03$, para F1 e F2, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Extrato / Substância Padrão	%I	F1	F2
E H J 30	$40,67 \pm 0,50$	$0,55 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$
E H J 50	$39,84 \pm 0,59$	$0,58 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,02$
E H J 70	$44,46 \pm 0,84$	$0,43 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,04$
E H S 30	$41,04 \pm 0,42$	$0,55 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$
E H S 50	$37,51 \pm 0,47$	$0,62 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,03$
E H S 70	$41,85 \pm 0,39$	$0,52 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,05$
Quercetina	$92,33 \pm 0,67$	$0,12 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,03$

E H J 30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; E H J 50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; E H J 70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; E H S 30: extrato hidroetanólico 30% setembro; E H S 50: extrato hidroetanólico 50% setembro; E H S 70: extrato hidroetanólico 70% setembro; %I: porcentagem de inibição da peroxidação lipídica. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias não diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Kalanchoe brasiliensis*

5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima e classificação do efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático

Os valores de CIM de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 para as cepas de referência e de rotina, obtidos pelo método de microdiluição em caldo, estão apresentados na Tabela 13 e 14, nessa ordem. EHJ70 e EHS70 mostraram-se os mais eficientes, sendo ativos frente a quatro das oito cepas de referência testadas [*S. aureus* (ATCC[®] 6538), *E. coli* (ATCC[®] 25922), *S. Typhimurium* (ATCC[®] 13311) e *S. Choleraesuis* (ATCC[®] 10708)], com CIM de 5000 µg/mL. EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 não foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* (ATCC[®] 29213), *E. coli* (ATCC[®] 10536), *P. aeruginosa* (ATCC[®] 9027) e *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853) nas concentrações testadas (Tabela 13).

Quanto às cepas de rotina, EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 mostraram-se ativos, sendo que EHJ30, EHJ50 e EHJ70 foram mais eficientes, inibindo o crescimento de nove das dez cepas testadas (MRSA 1485279, MRSA 1605677, MRSA 1664534, MRSA 1830466, *S. Enteritidis* 1406591, *S. Enteritidis* 1418594, *S. Enteritidis* 1428260, *Salmonella* spp. 1266695 e *Salmonella* spp. 1507788), com CIM de 5000 µg/mL. Nenhum dos extratos investigados foi capaz de inibir o crescimento de MRSA 1688441 nas concentrações testadas (Tabela 14).

Ampicilina e cloranfenicol (antibióticos-padrão) apresentaram valores de CIM dentro dos intervalos descritos no documento M100-S24 (CLSI, 2014) para as cepas bacterianas usadas para validação dos ensaios.

Tabela 13 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 e dos antibióticos-padrão frente às cepas de referência testadas

Cepa de Referência	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL						Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)		Antibiótico-Padrão
	Extrato						AMP**	CHL**	
	EHJ30	EHJ50	EHJ70	EHS30	EHS50	EHS70			
<i>S. aureus</i> (ATCC® 6538)	> 5000	> 5000	5000*	> 5000	> 5000	5000*	< 4	8	> 5000
<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213)	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	< 4 ^a	8 ^b	> 5000
<i>E. coli</i> (ATCC® 10536)	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	< 4	< 4	> 5000
<i>E. coli</i> (ATCC® 25922)	5000*	5000*	5000*	> 5000	> 5000	5000*	< 4 ^d	< 4 ^d	> 5000
<i>S. Choleraesuis</i> (ATCC® 10708)	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311)	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 9027)	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 500	64	> 5000
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 500 ^c	64 ^c	> 5000

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol.

*Para estes casos, os valores de CBM estavam acima de 5000 µg/mL, sendo o efeito bacteriostático.

**Os valores de CIM obtidos com AMP e CHL estavam de acordo com os intervalos de controle de qualidade reportados para organismos não fastidiosos pelo CLSI (2014), conforme documento M100-S24: (a) 0,5 a 2 µg / mL; (b) 2 a 16 µg / mL; (c) não reportado; (d) 2 a 8 µg / mL. Esses valores classificam essas bactérias como sensíveis, com exceção de *P. aeruginosa* (ATCC® 27853).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

Tabela 14 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 e dos antibióticos-padrão frente às cepas de rotina testadas

Cepa de Rotina	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL						Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)		
	Extrato						Antibiótico-Padrão		
	EHJ30	EHJ50	EHJ70	EHS30	EHS50	EHS70	AMP	CHL	
MRSA 1485279	5000*	5000*	5000*	> 5000	> 5000	5000*	500	125	> 5000
MRSA 1605677	5000*	5000*	5000*	5000*	> 5000	5000*	125	8	> 5000
MRSA 1664534	5000*	5000*	5000*	> 5000	> 5000	5000	32	8	> 5000
MRSA 1688441	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	250	250	> 5000
MRSA 1830466	5000*	5000*	5000*	5000*	> 5000	5000*	125	< 4	> 5000
<i>S. Enteritidis</i> 1406591	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000
<i>S. Enteritidis</i> 1418594	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000
<i>S. Enteritidis</i> 1628260	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000
<i>Salmonella</i> spp. 1266695	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	> 500	< 4	> 5000
<i>Salmonella</i> spp. 1507788	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	< 4	< 4	> 5000

EHJ30: extrato hidroetanólico 30% janeiro; EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro; EHS30: extrato hidroetanólico 30% setembro; EHS50: extrato hidroetanólico 50% setembro; EHS70: extrato hidroetanólico 70% setembro; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol.

*Para estes casos, os valores de CBM estavam acima de 5000 µg/mL, sendo o efeito bacteriostático.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA *in vivo*

5.7.1 Efeito do EHJ50 e EHJ70 sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton

Após 6 h da aplicação tópica de óleo de Cróton ocorreu um aumento expressivo da espessura da orelha com formação de edema no grupo controle ($158,00 \pm 10,64 \mu\text{m}$). EHJ50 reduziu a espessura do edema em 31,01; 35,44 e 37,97% nas doses de 0,10; 0,50 e 1,0 mg/orelha ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$), respectivamente, em relação ao grupo controle (Tabela 15). Nesta Tabela, observa-se, também, que EHJ70 nas doses citadas causou inibição de 42,41; 25,32 e 26,58%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$).

Medidas realizadas após 24 h de tratamento mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) da inibição da espessura do edema pelos extratos testados. Doses de 0,10; 0,50 e 1,0 mg/orelha de EHJ50 diminuíram a espessura do edema em 85,07; 79,10 e 84,33%, enquanto EHJ70 reduziu em 80,60; 74,63 e 78,36%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Considerando a massa do edema nesse tempo, os resultados corroboram a redução significativa ($p < 0,001$) da espessura nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, diminuindo em 62,03; 72,88 e 78,64% para EHJ50 e 71,19; 66,10 e 80,34%, nessa ordem, em comparação ao controle negativo. Como esperado, nos tempos avaliados dexametasona mostrou seu efeito anti-inflamatório (Tabela 15).

Tabela 15 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton após 6 e 24 horas de tratamento

Grupo	Dose	Espessura (μm)				Massa (mg)	
		6 h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)
Controle	20 μL /orelha	158,00 \pm 10,64	0	137,10 \pm 12,32	0	2,95 \pm 0,24	0
Dexametasona	0,1 mg/orelha	44,83 \pm 11,06 ^{***}	71,51	38,67 \pm 5,52 ^{***}	66,42	0,67 \pm 0,21 ^{***}	77,29
EHJ50	0,1 mg/orelha	108,70 \pm 0,011 ^{**}	31,01	19,50 \pm 3,92 ^{***}	85,07	1,12 \pm 0,18 ^{***}	62,03
	0,5 mg/orelha	101,70 \pm 0,001 ^{**}	35,44	27,67 \pm 5,87 ^{***}	79,10	0,80 \pm 0,12 ^{***}	72,88
	1,0 mg/orelha	97,67 \pm 0,021 ^{***}	37,97	21,05 \pm 4,98 ^{***}	84,33	0,63 \pm 0,13 ^{***}	78,64
EHJ70	0,1 mg/orelha	91,00 \pm 0,007 ^{***}	42,41	25,5 \pm 5,64 ^{***}	80,60	0,85 \pm 0,18 ^{***}	71,19
	0,5 mg/orelha	118,00 \pm 7,45 ^{**}	25,32	34,17 \pm 4,20 ^{***}	74,63	1,00 \pm 0,12 ^{***}	66,10
	1,0 mg/orelha	115,50 \pm 10,27 ^{**}	26,58	28,83 \pm 5,21 ^{***}	78,36	0,58 \pm 0,18 ^{***}	80,34
Basal	-	3,50 \pm 1,54 ^{***}	-	4,33 \pm 0,76 ^{***}	-	0,02 \pm 0,01	

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 6). ^{**} $p < 0,01$, ^{***} $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.2 Efeito do EHJ50 e EHJ70 sobre o edema de orelha induzido por fenol

A aplicação tópica de fenol na orelha de camundongos resultou no aumento da espessura quando avaliada 2 h após o desafio. O tratamento com EHJ50 reduziu significativamente ($p < 0,001$) a espessura do edema em 96,46; 96,49 e 96,54% nas doses de 0,10; 0,50 e 1,0 mg/orelha em comparação ao grupo controle, respectivamente (Tabela 16). Quando comparado ao grupo controle, doses de 0,10; 0,50 e 1,0 mg/orelha de EHJ70 causaram inibição significativa ($p < 0,001$) do edema de orelha em 96,49; 96,56 e 96,74%, nessa ordem. Adicionalmente, EHJ50 e EHJ70 promoveram um significativo efeito anti-inflamatório ($p < 0,001$), com mais de 93% de inibição da massa do edema. Dexametasona foi efetiva em ambas as medidas (espessura e massa).

Tabela 16 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por fenol

Grupo	Dose	Espessura (μm)	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
Controle	20 μL /orelha	355,30 \pm 7,99	-	7,82 \pm 0,28	-
Dexametasona	0,1 mg/orelha	96,83 \pm 4,36 ^{***}	72,74	4,83 \pm 0,17	38,24
EHJ50	0,1 mg/orelha	12,56 \pm 1,24 ^{***}	96,46	0,50 \pm 0,08	93,60
	0,5 mg/orelha	12,44 \pm 0,70 ^{***}	96,49	0,54 \pm 0,08	93,09
	1,0 mg/orelha	12,28 \pm 0,37 ^{***}	96,54	0,39 \pm 0,07	95,01
EHJ70	0,1 mg/orelha	12,44 \pm 2,26 ^{***}	96,49	0,52 \pm 0,05	93,35
	0,5 mg/orelha	12,22 \pm 1,76 ^{***}	96,56	0,45 \pm 0,06	94,24
	1,0 mg/orelha	11,61 \pm 1,65 ^{***}	96,73	0,34 \pm 0,09	95,65
Basal	-	3,83 \pm 0,75 ^{***}	-	0,19 \pm 0,04	-

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 6). *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.3 Efeito do EHJ50 e EHJ70 sobre o edema de orelha induzido por histamina

A aplicação intradérmica de histamina na orelha de camundongos resultou no aumento da espessura e massa quando avaliada 2 horas após o desafio. EHJ50 e EHJ70 não promoveram inibição significativa dos parâmetros inflamatórios induzidos por este agente irritante (Tabela 17). Dexametasona (controle positivo) foi ativa, produzindo 59,59 e 58,80% de inibição da espessura e massa do edema de orelha, respectivamente, quando comparada ao grupo controle.

Tabela 17 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por histamina

Grupo	Dose	Espessura (μm)	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
Controle	20 μL /orelha	84,56 \pm 9,48	-	3,01 \pm 0,25	-
Dexametasona	0,1 mg/orelha	34,17 \pm 4,82 ^{***}	59,59	1,24 \pm 0,08 ^{***}	58,80
EHJ50	0,1 mg/orelha	61,00 \pm 8,72	27,86	2,29 \pm 0,21	23,92
	0,5 mg/orelha	72,13 \pm 6,28	14,70	2,70 \pm 0,23	10,30
	1,0 mg/orelha	93,17 \pm 9,76	-	2,84 \pm 0,20	5,65
EHJ70	0,1 mg/orelha	107,30 \pm 6,66	-	2,78 \pm 0,21	7,64
	0,5 mg/orelha	83,36 \pm 8,42	1,18	2,27 \pm 0,20	24,58
	1,0 mg/orelha	101,60 \pm 8,89	-	2,58 \pm 0,20	14,29
Basal	-	9,06 \pm 1,21 ^{***}	-	0,72 \pm 0,12 ^{***}	-

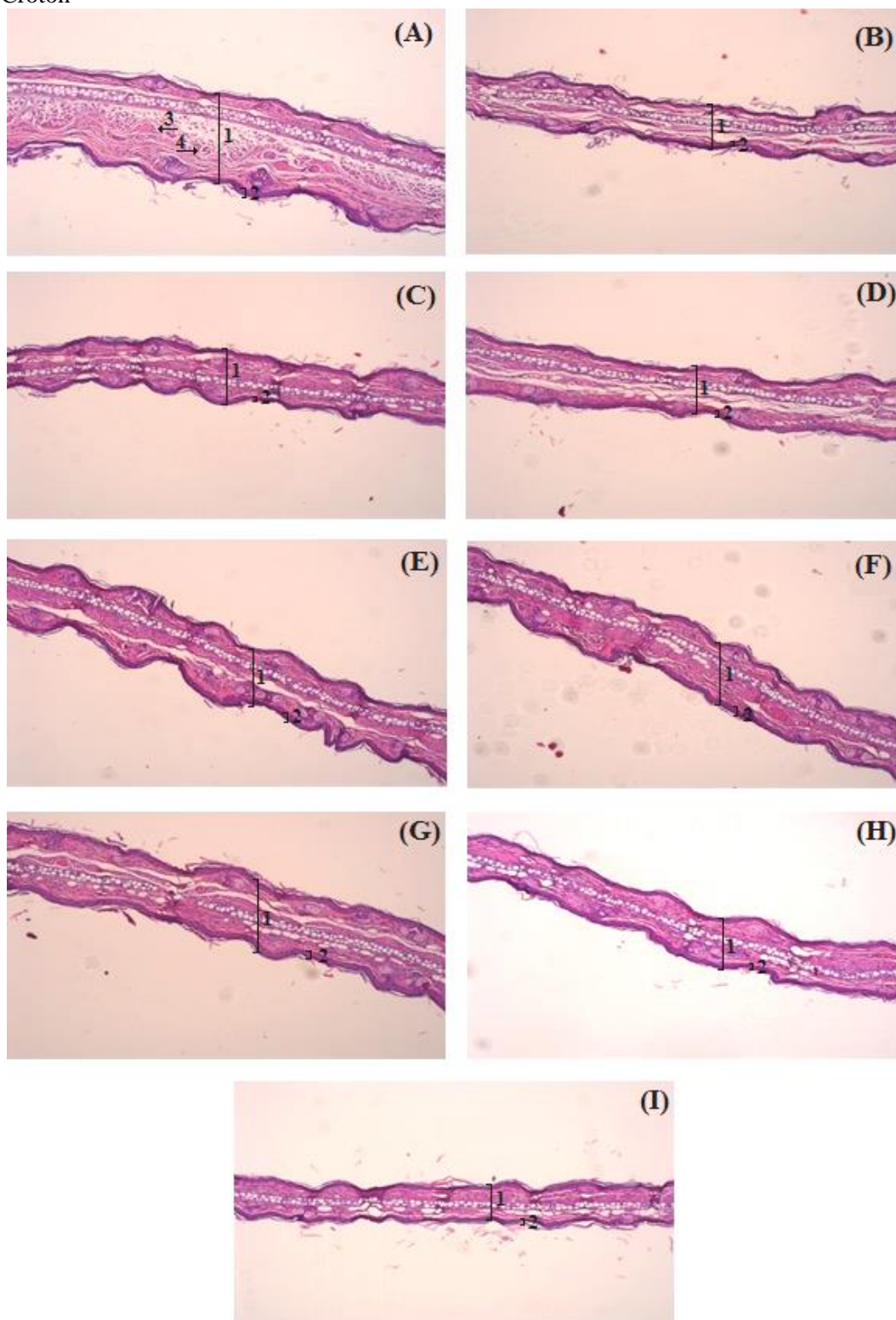
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 6). *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.4 Análise histopatológica

Para confirmação do efeito anti-inflamatório tópico de EHJ50 e EHJ70 observado na Tabela 15, procedeu-se à análise histopatológica dos parâmetros de inflamação. Na Figura 43 são mostrados cortes representativos (100x) de orelhas de camundongos de cada grupo experimental. A análise destes cortes histológicos demonstrou que, após 24 horas da aplicação tópica do óleo de Cróton, ocorreu uma formação expressiva do edema, com aumento da espessura da orelha, bem como vasodilatação e infiltração de leucócitos polimorfonucleares no grupo controle (Figura 43A). Os dados também revelaram que os parâmetros inflamatórios (edema e infiltração leucocitária) foram suprimidos após tratamento com EHJ50 e EHJ70 nas doses utilizadas (0,1; 0,5 e 1 mg/orelha), conforme se observa nas Figuras 43C a 43H, respectivamente. Dexametasona (0,1 mg/orelha; controle positivo) foi efetiva em reduzir os parâmetros inflamatórios (Figura 43B). Problemas operacionais relativos ao microscópio não permitiram a obtenção de imagens dos cortes histológicos com a qualidade pretendida.

Figura 43 - Análise histológica do efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton



Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 100 μ m). (A) Controle (solução salina); (B) dexametasona 0,1 mg/orelha; (C): EBJ50 0,1 mg/orelha; (D): EBJ50 0,5 mg/orelha; (E): EBJ50 1,0 mg/orelha; (F): EBJ70 0,1 mg/orelha; (G): EBJ70 0,5 mg/orelha; (H): EBJ70 1,0 mg/orelha; (I): Basal. Números: 1 (derme), 2 (epiderme), 3 (vasodilatação) e 4 (leucócitos).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.5 Efeito do EHJ50 e EHJ70 sobre mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

A ação do óleo de Cróton promoveu um aumento significativo na MPO do grupo controle (Tabela 18). Nos grupos submetidos ao tratamento com EHJ50 e EHJ70, doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha reduziram esta enzima em 81,74; 61,29 e 63,62% (EHJ50) e 69,96; 55,27 e 77,17% (EHJ70), respectivamente ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle. Dexametasona inibiu em 69,73% a MPO. Pela análise da Tabela 18 também se observa que a concentração de NAG aumentou significativamente no grupo controle negativo após indução do edema com óleo de Cróton. As doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha de EHJ50 diminuíram a concentração desta enzima em 74,80; 69,04 e 70,41%, enquanto EHJ70 causou inibição de 76,16; 76,43 e 80,82%, nessa ordem, quando comparado ao grupo controle. Dexametasona foi efetiva em reduzir a concentração da NAG em 44,93%.

Tabela 18 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Grupo	Dose	MPO (mDO de proteína)	Inibição (%)	NAG (mDO de proteína)	Inibição (%)
Controle	20 µL/orelha	10,82 ± 0,39	-	6,16 ± 0,26	-
Dexametasona	0,1 mg/orelha	3,27 ± 0,86***	69,73	4,02 ± 0,08***	44,93
	0,1 mg/orelha	1,97 ± 0,19***	81,74	2,28 ± 0,13***	74,80
EHJ50	0,5 mg/orelha	4,18 ± 0,12***	61,29	0,42 ± 0,06***	69,04
	1,0 mg/orelha	3,93 ± 0,59***	63,62	1,14 ± 0,18***	70,41
	0,1 mg/orelha	3,25 ± 0,06***	69,96	1,96 ± 0,11***	76,16
EHJ70	0,5 mg/orelha	4,84 ± 0,13***	55,27	1,21 ± 0,06***	76,43
	1,0 mg/orelha	2,47 ± 0,16***	77,17	0,67 ± 0,75***	80,82
Basal	-	0,94 ± 0,02***	-	0,13 ± 0,01***	-

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 3). *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.6 Efeito do EHJ50 e EHJ70 sobre a produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada após aplicação tópica de óleo de Cróton na orelha de camundongos, resultando no aumento da concentração no grupo controle (Tabela 19). As aplicações tópicas de EHJ50 e EHJ70 nas doses de 0,10; 0,50 e 1,0 mg/orelha foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,001$) em 46,74; 52,24 e 57,74% (EHJ50) e 61,16; 62,80 e 67,43% (EHJ70), respectivamente, em relação ao grupo controle. Por sua ação anti-inflamatória, dexametasona reduziu a produção de NO em 56,09%.

Tabela 19 - Efeito dos extratos hidroetanólicos 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* coletadas em janeiro de 2016 sobre a produção de óxido nítrico (NO)

Grupo	Dose	NO (μM)	Inibição (%)
Controle	20 μL /orelha	12,76 \pm 0,13	-
Dexametasona	0,1 mg/orelha	8,21 \pm 0,07***	56,09
EHJ50	0,1 mg/orelha	9,96 \pm 0,28***	46,74
	0,5 mg/orelha	8,93 \pm 0,19**	52,24
	1,0 mg/orelha	7,90 \pm 0,95***	57,74
EHJ70	0,1 mg/orelha	7,26 \pm 0,18***	61,16
	0,5 mg/orelha	6,95 \pm 0,21***	62,80
	1,0 mg/orelha	6,09 \pm 0,12***	67,43
Basal	-	5.678 \pm 0,10	-

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 3). *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

5.7.7 Efeito de EHJ50 e EHJ70 sobre a produção de citocinas

A produção de IL-6 foi aumentada após aplicação tópica de óleo de Cróton na orelha de camundongos do grupo controle (445,50 \pm 13,54 pg/mL). O tratamento com EHJ50 e EHJ70 mostrou que a dose de 1,0 mg/orelha foi capaz de reduzir a produção de IL-6 em 20,59 e 22,78%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Tabela 20). Nessa mesma dose (1,0 mg/orelha), EHJ50 e EHJ70 inibiram a produção de TNF- α em 16,71 e 23,71%, nessa ordem. Dexametasona foi efetiva para ambas citocinas.

Tabela 20 - Efeito dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* sobre produção de citocinas

Grupo	Dose	IL-6 (pg/ml)	Inibição (%)	TNF- α (pg/ml)	Inibição (%)
Controle	20 μ L/orelha	445,50 \pm 13,54	-	396,50 \pm 8,72	-
Dexametasona	0,1 mg/orelha	357,50 \pm 6,95 ^{***}	19,75%	322,25 \pm 9,59 ^{***}	18,72%
EHJ50	0,1 mg/orelha	436,25 \pm 10,36	2,07%	383,00 \pm 19,27	3,40%
	0,5 mg/orelha	435,00 \pm 13,29	2,36%	377,75 \pm 8,50	4,73%
	1,0 mg/orelha	353,75 \pm 12,83 ^{***}	20,59%	330,25 \pm 6,97 ^{***}	16,71%
EHJ70	0,1 mg/orelha	438,00 \pm 9,25	1,68%	398,75 \pm 7,24	-
	0,5 mg/orelha	437,25 \pm 5,10	1,85%	340,00 \pm 9,44	14,25%
	1,0 mg/orelha	344,00 \pm 5,90 ^{***}	22,78%	302,50 \pm 5,36 ^{***}	23,71%
Basal	-	231,75 \pm 15,33 ^{***}	-	105,25 \pm 10,55 ^{**}	-

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 3). *** p < 0,001 diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. EHJ50: extrato hidroetanólico 50% janeiro; EHJ70: extrato hidroetanólico 70% janeiro.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a composição química e as atividades antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 30%, 50% e 70% das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae) coletadas em janeiro (EHJ30, EHJ50 e EHJ70) e em setembro (EHS30, EHS50 e EHS70), assim como a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* dos extratos das folhas dessa espécie vegetal coletadas em janeiro (EHJ50 e EHJ70), visando fornecer subsídio científico para seu uso popular.

Após a cuidadosa seleção da espécie vegetal, a extração é o primeiro passo para contribuir com o sucesso do resultado final e do desfecho de qualquer estudo envolvendo plantas medicinais (AZMIR et al., 2013), estando bem estabelecido que o método de extração pode influenciar fortemente a composição química do extrato e sua atividade biológica (ATANASOV et al., 2015).

Segundo Azmir e colaboradores (2013), independente do desenvolvimento de métodos não convencionais tais como ultrassom, campo elétrico pulsado, digestão enzimática, extrusão, aquecimento por micro-ondas, aquecimento ôhmico, fluídos supercríticos e solventes acelerados, os procedimentos tradicionais continuam a ser uma maneira acessível e barata de se obter extratos de plantas, bem como são referências importantes para a comparação com essas novas metodologias propostas. Assim, até o presente momento não existe relato na literatura de um método considerado de escolha para esta obtenção, sendo disponibilizadas várias opções visando à obtenção de extratos a partir das mais diversas espécies vegetais.

Considerando a espécie *K. brasiliensis*, esta questão não é diferente e não se observa um método padronizado com o objetivo de detectar e isolar seus constituintes químicos e de investigar suas atividades biológicas. Sob esta ótica, os estudos científicos disponíveis reportam distintas formas de obtenção de extratos a partir desta planta medicinal, tais como extração mecânica das folhas e caules (COSTA et al., 1994) ou somente das folhas (IBRAHIM et al., 2002; MOURÃO et al., 1999) com auxílio de um triturador mecânico industrial (liquidificador ou processador de alimentos) para obtenção do "suco"; maceração estática com água destilada das folhas seguida de aquecimento a 50 - 60 °C por 30 min (FERREIRA; ROSENTHAL; CARVALHO, 2000) ou das partes aéreas frescas mantidas em contato durante 24 horas em temperatura ambiente e posterior evaporação rotativa a 40 °C (FONSECA et al., 2004) para obtenção de extrato aquoso; maceração com etanol a 90% à temperatura ambiente

das folhas dessecadas (SILVA et al., 2009) ou extração mecânica com etanol 50% (p/v) e auxílio de triturador mecânico industrial das folhas frescas (COSTA et al., 2014; MEDEIROS; WANDERLEY, 2009), para preparo de extrato hidroetanólico 90% e 50%, nessa ordem; extração de pecíolo e folhas com metanol acidificado com ácido clorídrico a 1% (CRUZ et al., 2012) para preparo de extrato metanólico; e, finalmente, extração à frio das folhas com hexano, acetato de etila e metanol seguida de evaporação sob pressão reduzida para obtenção dos extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico (TREVISAN et al., 2006).

De acordo com Cechinel e Yunes (1998), um dos métodos mais adequados para a análise químico-farmacológica de plantas medicinais seria a preparação de um extrato hidroalcoólico 50% [etanol:água (50:50), v/v], considerado análogo às tinturas preparadas com base no uso popular, onde partes ativas das espécies vegetais são misturadas às bebidas alcoólicas. Neste sentido, e conforme descrito no item 4.2 à página 64, para o preparo dos extratos hidroetanólicos das folhas de *K. brasiliensis* coletadas em janeiro e setembro de 2016 (EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70), optou-se pelo método preconizado por Costa e colaboradores (2014), com pequenos ajustes, que visou a análise da influência da porcentagem de etanol na composição química dos extratos obtidos e, conseqüentemente, nas atividades biológicas estudadas. Para tanto, foram empregadas proporções de 30, 50 e 70% etanol:água (v/v), conforme proposto por Seo e colaboradores (2014). Adicionalmente, também foram efetuadas coletas em dois períodos, janeiro e setembro, com o intuito de se verificar a provável interferência dos aspectos fenológicos sobre a expressão dos metabólitos secundários presentes nesta espécie vegetal e, conseqüentemente, sobre as atividades biológicas investigadas.

Pela análise dos resultados das massas e dos rendimentos do EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70, pode-se observar uma diferença significativa entre os dois períodos de coleta, variando de 3,44 (EHJ30) a 4,14% (EHJ50) em janeiro e de 3,04 (EHS30) a 3,60% (EHS70) em setembro, embora o mesmo não aconteça ao se empregar 50% ou 70% de etanol para o preparo dos extratos (Tabela 6, página 85). Esta diferença de rendimento entre ambos os períodos, com maiores percentuais observados com os extratos obtidos das folhas coletadas em janeiro, excetuando-se EHS70, pode ser devido à correlação positiva entre a intensidade de radiação solar e a produção de substâncias, tais como flavonoides, taninos e antocianinas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Cruz e colaboradores (2011) estudaram o desenvolvimento químico e agrônomico de *K. brasiliensis* sobre diferentes níveis de luz e temperatura e demonstraram que a produção e o teor de matéria seca das folhas foram proporcionais à luminosidade, o que concorda com nosso estudo, visto que EHJ30, EHJ50 e EHJ70 obtidos dessas partes da planta coletadas em janeiro, apresentaram maiores porcentagens de rendimento quando comparadas às de EHS30, EHS50 e EHS70 preparados a partir das folhas coletadas em setembro. Vale ressaltar que, no Brasil, o verão, estação compreendida entre os meses de dezembro e março, é caracterizado pelo aumento da incidência de radiação solar [variação de 16 de radiação solar global diária, média mensal ($\text{MJ} / \text{m}^2 \cdot \text{dia}$) em janeiro, para 14 em setembro] (TIBA, 2000).

Quanto à composição química, o perfil de *K. brasiliensis* tem sido objeto de estudo e ainda são escassos os relatos na literatura sobre esse tema, sendo flavonoides a classe química mais importante descrita nessa espécie vegetal, especialmente aqueles derivados da patuletina (flavonol) (COSTA et al., 1994; COSTA et al., 2014; CRUZ et al., 2011; FERNANDES et al., 2016), e mais recentemente da eupafolina (flavona) (FERNANDES et al., 2016).

Os resultados da caracterização química de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 por CLAE-DAD investigados no nosso estudo demonstraram a presença de flavonoides, tendo como base as características do espectro UV de forma qualitativa para cada pico analisado, com máximos de absorção entre 330 a 360 para a banda A e 250 a 265 nm para a banda B permitindo, dessa forma, a sugestão da presença dessa classe de substâncias nesses extratos, especialmente de flavonóis e flavonas (TSIMOGIANNIS et al., 2006), concordantes com os achados na literatura. Assim, embora na presente investigação não tenha sido possível a identificação de uma substância nos extratos analisados, os resultados obtidos por CLAE-DAD sugerem a presença de seis flavonoides em EHJ30, EHJ50 e EHJ70 e de sete em EHS30, EHS50 e EHS70 por meio da comparação dos t_r s e da similaridade dos cromatogramas quando comparados entre si.

Costa e colaboradores (2014), empregando condições cromatográficas distintas das utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa, reportaram a presença de uma (1) substância majoritária no perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD. No presente estudo, porém, observou-se a presença de duas substâncias majoritárias (picos 3 e 5) nos extratos analisados. Pela observação das Figuras 28, 29 e 30 (páginas 89 e 90), nota-se que os perfis cromatográficos de EHJ30 e EHJ70 foram visualmente semelhantes, e que

houve uma sutil diferença no de EHJ50 em relação aos sinais referentes aos picos 3 e 5 quando comparados à esses extratos. As Figuras 35, 36 e 37 (páginas 95 e 96) permitem observar que os perfis cromatográficos de EHS30, EHS50 e EHS70 revelaram uma diminuição do pico 3 e uma elevação do pico 5 quando comparados à EHJ30, EHJ50 e EHJ70. Ainda, a análise dos perfis cromatográficos de EHS30, EHS50 e EHS70 permitiu a observação do surgimento do sinal do pico 7, ausente nos cromatogramas de EHS30, EHS50 e EHS70.

Em relação à quantificação de fenóis totais, esse ensaio revelou a presença dessas substâncias nos extratos analisados, sendo o aumento do teor diretamente proporcional ao percentual de etanol utilizado (Tabela 8, página 100). Os teores variaram de 26,66 a 30,11 mg/g de EAT para EHJ30, EHJ50 e EHJ70 e de 25,47 a 27,06 mg/g de EAT para EHS30, EHS50 e EHS70, sendo que EHJ70 apresentou a maior concentração dessas substâncias (30,11 mg/g de EAT). Os teores de flavonoides totais (Tabela 9, página 101), por sua vez, variaram de 15,43 a 16,95 mg/g de ER para EHJ30, EHJ50 e EHJ70 e de 11,84 a 13,33 mg/g de ER para EHS30, EHS50 e EHS70 destacando, novamente, EHJ70 (16,95 mg/g de ER).

Conforme descrito na literatura, o teor de flavonoides totais em extratos de *K. brasiliensis* é influenciado pelas condições climáticas, sendo este conteúdo potencializado quando essa espécie vegetal é exposta à luminosidade (CRUZ et al., 2011). Cruz e colaboradores (2011) reportaram o teor de 171,00 mg/g em equivalente a quercetina (EQ) no extrato metanólico de folhas secas desta planta, que se elevou para 219,58 mg/g de EQ no extrato metanólico dessas partes vegetais quando submetidas à luz solar plena. Os resultados deste estudo não puderam ser comparados com os observados pelo nosso grupo de pesquisa, visto que foram obtidos em condições experimentais totalmente distintas. Porém, Seo e colaboradores (2014) demonstraram que o teor de flavonoides totais é fortemente influenciado pela polaridade do solvente usado no processo de extração de modo que, quando água, etanol e metanol foram investigados, conforme apresenta a Figura 9A descrita no item 2.3.1 Flavonoides: aspectos gerais, constante à página 45, esse conteúdo foi maior nos extratos aquoso e etanólico do que no metanólico. Ainda, de acordo com estes autores, o percentual de 70% de etanol seria o mais eficiente (Figura 9B). Este achado pode ser confirmado por nosso grupo de pesquisa, visto que os extratos com teores de flavonoides mais expressivos foram EHJ70 e EHS70 e que EHJ revelou os maiores conteúdos provavelmente em virtude da maior incidência de radiação solar do mês de janeiro se

comparado a setembro (TIBA, 2000).

Os dados de quantificação de fenóis e flavonoides totais bem como os de caracterização química corroboraram os resultados apresentados nos ensaios de atividades antioxidante e antibacteriana *in vitro* e anti-inflamatória tópica *in vivo* que serão discutidos a seguir, sugerindo a relação entre compostos fenólicos, principalmente flavonoides, e atividades biológicas (ABE et al., 2007; CUSHNIE; LAMB, 2005; DZIALO et al., 2016; KIM et al., 2004; SEO et al., 2014).

A atividade antioxidante *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foi avaliada por meio de ensaios que diferem entre si pelo mecanismo antioxidante que os fundamenta, sendo utilizados os métodos do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de redução da complexação do fosfomolibdênio e da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico; inclusive, segundo revisão atualizada da literatura, até o presente momento não existe relato de avaliação desta atividade biológica para *K. brasiliensis* utilizando essa ferramenta.

Por meio do ensaio do sequestro do radical DPPH•, EHJ30, EHJ50 e EHJ70 revelaram menores valores de CE₅₀ quando comparados àqueles obtidos com EHS30, EHS50 e EHS70, sendo EHJ50 o que demonstrou menor resultado (CE₅₀ igual a 58,08 μ g/mL) e, conseqüentemente, melhor capacidade de sequestro ou capacidade antioxidante por esse método (Tabela 10, página 102). Segundo Melo e colaboradores (2008), a capacidade do sequestro do radical DPPH• pode ser classificada como forte, moderada ou fraca de acordo com o percentual obtido, ou seja, 70%, entre 50 e 70%, ou abaixo de 50%, respectivamente, o que permitiu categorizar EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 como possuidores de moderada capacidade de sequestro.

Os resultados de AAR% de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70, obtidos pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio, demonstraram que esses extratos apresentam fraca atividade antioxidante e que os maiores valores de AAR% foram observados com EHJ50 e EHJ70, que não diferiram entre si (16,73 e 16,78 AAR%, nessa ordem) (Tabela 11, página 103). Estes achados sugerem que esta atividade biológica avaliada por este método possa ser atribuída aos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroetanólicos testados.

Por meio do ensaio de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, os resultados descritos no item 5.5.3 (Tabela 12, página 104) mostraram que EHJ70 apresentou maior atividade antioxidante dentre os extratos avaliados, com inibição da peroxidação lipídica de 44,46%. Neste teste, a quercetina (controle positivo)

demonstrou 92,33% desta inibição. Através da análise das curvas de decaimento da absorvância deste sistema em função do tempo em minutos (Figura 42, página 104), ao comparar a curva do controle com as demais percebe-se que EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 foram capazes de retardar e reduzir a oxidação do β -caroteno, sendo que EHJ70 apresentou o menor perfil de decaimento, revelando-se o mais eficiente entre os extratos investigados.

Adicionalmente, a lipoperoxidação é um processo que envolve três etapas, iniciação, propagação e terminação, de modo que os antioxidantes podem agir inibindo a iniciação desse processo ao neutralizar as EROs do meio ou inibindo a propagação da lipoperoxidação ao neutralizar os radicais peroxila formados pela oxidação dos lipídeos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; LIMA; ABDALLA, 2001). Para que a etapa da lipoperoxidação em que os extratos atuariam pudesse ser conhecida, foram avaliados os fatores cinéticos da oxidação F1 (mede-se a eficiência do antioxidante em bloquear a reação em cadeia por meio de interação com os radicais peróxidos; mecanismo primário) e F2 (infere-se a possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo, como por exemplo, decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, produzindo espécies radicalares que aceleram a oxidação no sistema; mecanismo secundário) (BROINIZI et al., 2007). Conforme descrito por Broinizi e colaboradores (2007), com base no estudo de Yanishlieva e Marinova (1995), os valores dos fatores cinéticos F1 e F2 permitem caracterizar a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, de modo que $F1 < 1$ indica que os antioxidantes são capazes de inibir os radicais livres durante o período de indução, $F2 < 1$ sugere que os antioxidantes podem regenerar o radical antioxidante formado e $F1$ e $F2 \geq 1$ indicam atividade pró-oxidante, sendo maior a eficiência do antioxidante quanto mais distante os valores estiverem de 1 (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 12 constante à página 104, observa-se que os valores de F1 e F2 foram < 1 , sugerindo que EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 podem inibir a oxidação tanto pelo mecanismo primário quanto pelo secundário e que apresentam menor atividade antioxidante. Essa atividade biológica pode ser atribuída aos compostos fenólicos, particularmente flavonoides (BROINIZI et al., 2007) presentes nestes extratos, e que podem agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica. A quercetina, substância utilizada como controle positivo, revelou um baixo valor de F1 (0,12), indicando uma ação sobre o mecanismo primário da oxidação, enquanto o valor de F2

foi de 0,53, semelhante ao obtido com EHJ70 de 0,57, sugerindo também um efeito sobre o mecanismo secundário. A atividade antioxidante da quercetina ocorre devido à sua estrutura química, flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, sendo que duas dessas estão ligadas ao anel B (anel que possui maior atividade redutora), apresentando estabilidade por ressonância (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Quanto à atividade antibacteriana *in vitro*, com exceção dos resultados obtidos com EHS30 e EHS50 frente a *S. aureus* (ATCC[®] 6538), *E. coli* (ATCC[®] 25922), MRSA 1485279, MRSA 1664534 e MRSA 1688441; EHJ30 e EHJ50 frente a *S. aureus* (ATCC[®] 6538) e MRSA 1688441; EHJ70 e EHS70 frente a MRSA 1688441; e EHS50 frente a MRSA 1606677 e MRSA 1830466, nas demais situações os extratos hidroalcoólicos testados mostraram-se ativos frente a *S. aureus* (ATCC[®] 6538), *E. coli* (ATCC[®] 25922), *S. Cholerasuis* (ATCC[®] 10708), *S. Typhimurium* (ATCC[®] 13311), MRSA 1485279, MRSA 1605677, MRSA 1830466, MRSA 1664534, MRSA 1688441, *S. Enteritidis* 1406591, *S. Enteritidis* 1418594, *S. Enteritidis* 1428260, *Salmonella* spp. 1266695 e *Salmonella* spp. 1507708, com CIM de 5000 µg/mL e efeito bacteriostático, não sendo determinada a CBM em virtude do gradiente de concentração estabelecido. Entre EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 investigados, EHJ70 e EHS70 mostraram-se mais efetivos, sendo capazes de inibir quatro das oito cepas de referência e todas as de rotina testadas (Tabelas 13 e 14, páginas 106 e 107).

Em 2009, Silva e colaboradores, ao investigarem a atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico a 90% (EHF) nas concentrações de 10, 500 e 1000 mg/mL e óleo essencial de folhas secas e alcoolatura de caule de *K. brasiliensis* frente a *S. aureus* (ATCC[®] 6538), *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC[®] 14028), *P. aeruginosa* (ATCC[®] 15442) e cepas de rotina de *S. aureus* (11), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Micrococcus luteus* por meio da determinação da CIM pelo método de difusão, observaram que EHF foi ativo somente frente a *S. aureus* (ATCC[®] 6538) e a cepa de rotina *S. aureus* 259I, com CIM de 1000 mg/mL (1×10^6 µg/mL).

Conforme apresentado anteriormente, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os achados de Silva e colaboradores (2009) quanto à ação antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC[®] 6538) e destacam o efeito antibiótico dos extratos hidroalcoólicos obtidos das folhas de *K. brasiliensis* sobre cepas de rotina dessa espécie, principalmente em virtude da adição das cinco cepas de rotina MRSA no painel testado. Vale ressaltar que, conforme descrito por Costa e colaboradores (2016), estas

cepas MRSA foram re-investigadas pelo método de microdiluição em caldo como possíveis *S. aureus* com heterorresistência (do inglês *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* - hVISA) ou resistência intermediária a vancomicina (do inglês *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* - VISA), apesar da classificação como sensíveis pelo sistema automatizado VITEK[®]2, o que potencializa este dado científico. Em relação às cepas Gram-negativas, diferente destes autores, nosso grupo de pesquisa observou que EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70, com exceção das situações descritas anteriormente, foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* (ATCC[®] 25922), *S. Cholerasuis* (ATCC[®] 10708), *S. Typhimurium* (ATCC[®] 13311), *S. Enteritidis* 1406591, *S. Enteritidis* 1418594, *S. Enteritidis* 1428260, *Salmonella* spp. 1266695 e *Salmonella* spp. 1507708, com CIM de 5000 µg/mL e efeito bacteriostático.

Ainda que de acordo com a classificação de Kuete (2010) os valores de CIM obtidos categorizem a atividade antibacteriana *in vitro* de EHJ30, EHJ50, EHJ70, EHS30, EHS50 e EHS70 como fraca (CIM > 625 µg/mL), os resultados obtidos no presente estudo são relevantes em função do cenário alarmante da resistência bacteriana mundial; inclusive, a OMS publicou a lista das 20 bactérias mais resistentes aos medicamentos a nível global [prioridade crítica (1), alta (2) e média (3)], que exigem ação imediata da comunidade científica para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos visando tratá-las (WHO, 2017). Entre estes micro-organismos, são observados *E. coli* (resistente a carbapenem; resistente a cefalosporina de 3^a geração) (prioridade 1), *S. aureus* [MRSA, VISA e *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (VRSA)] (prioridade 2) e *Salmonella* spp. (resistente a fluoroquinolonas) (prioridade 2) (WHO, 2017), o que comprova a relevância destes achados. Adicionalmente, vale ressaltar que, conforme também reportado pela OMS,

"future R&D strategies should focus on the discovery and development of new antibiotics specifically active against multidrug- and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria" (WHO, 2017) - "futuras estratégias de I&D devem se concentrar na descoberta e no desenvolvimento de novos antibióticos especificamente ativos contra bactérias Gram-negativas multirresistentes e extensivamente resistentes aos medicamentos" (tradução livre).

A atividade antibacteriana *in vitro* de *K. brasiliensis* observada no presente estudo pode ser devida à presença de compostos fenólicos, particularmente flavonoides (flavonol e flavona), conforme discutido na caracterização química dessa espécie

vegetal. Segundo Cushnie e Lamb (2011), o efeito antibacteriano dos flavonoides ocorre em função de três mecanismos, a saber: i) dano à membrana citoplasmática, causado por perfuração e/ou redução da fluidez da membrana; ii) inibição da síntese de ácido nucleico, decorrente da inibição da topoisomerase; e iii) inibição do metabolismo energético, gerada pela inibição da síntese de trifosfato de adenosina (ATP). De fato, este importante artigo de revisão reúne evidências de que os flavonoides possuem vários mecanismos de ação associados ao efeito antibacteriano, não agindo por um único modo (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Espécies do gênero *Kalanchoe* são tradicionalmente utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, lesões, abscessos e gânglios dilatados (LUCAS; MACHADO, 1946; PAIVA et al., 2008a; ROSSI-BERGMANN et al., 1997). Extratos hidroetanólicos das folhas desta planta medicinal obtidos antes e durante a floração foram avaliados por Mourão e colaboradores (1999) em modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados deste estudo demonstraram um efeito anti-inflamatório para o extrato obtido antes da floração e um efeito pró-inflamatório para aquele preparado durante a floração (MOURÃO et al., 1999). Posteriormente, *K. brasiliensis* foi estudada no modelo de edema de pata induzido por *zymosan*, que caracteriza inflamação do tipo artrite crônica quando injetado nas articulações do joelho (IBRAHIM et al., 2002). O tratamento mostrou uma inibição do edema de pata, assim como redução da infiltração de leucócitos e fluxo sanguíneo (IBRAHIM et al., 2002). O efeito anti-inflamatório de *K. brasiliensis* foi comprovado em função da presença de um sal orgânico denominado kalanchosídeo dimalato (complexo kalanchosine e ácido málico), isolado do suco de suas partes aéreas, evidenciando assim um de seus agentes anti-inflamatórios (COSTA et al., 2006; IBRAHIM et al., 2002; PAIVA et al., 2008a).

Apesar dos relatos da atividade anti-inflamatória sistêmica e do agente anti-inflamatório kalanchosídeo dimalato de *K. brasiliensis*, até o presente momento não existe descrição na literatura científica de investigação do potencial anti-inflamatório tópico dessa espécie vegetal. A utilização do modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos permite investigar o potencial anti-inflamatório por via tópica (GÁBOR, 2000), tendo a vantagem de identificar substâncias que apresentam uma absorção cutânea apropriada, de forma a atingir um efeito farmacológico (BOUCLIER et al., 1990).

O óleo de Cróton é uma substância altamente irritante que estimula uma resposta inflamatória na epiderme (SILVA et al., 2015) e tem como principal agente o

12-o-tetra-canoilforbol-13-acetato (TPA) (PINTO et al., 2015). A resposta inflamatória induzida por este agente flogístico inclui edema associado à vasodilatação e infiltração de leucócitos com estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares (PATRICK; BURKHALTER; MAIBACH, 1987). O processo inflamatório é causado pela liberação de prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), histamina, bradicinina, fator ativador de plaquetas (PAF) e interleucina-1 (PHANSE et al., 2012). Acredita-se que estes efeitos sejam mediados pela proteína quinase C (PASSOS et al., 2013). Muitas proteínas quinases C são ativadas pelo diacilglicerol e por níveis elevados de cálcio intracelular, ambos produzidos pela ativação de receptores acoplados à proteína G; a proteína quinase C medeia um número de vias de transdução de sinal intracelulares implicadas na patogênese da inflamação, incluindo a liberação de ácido araquidônico dependente de fosfolipase A₂ e a produção de eicosanoides (SILVA et al., 2015). TPA também induz à expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos, que são conhecidos por desempenhar algum papel na inflamação da pele (REDONDO et al., 1997; WILMER et al., 1994). Por outro lado, estas vias de mediadores são bloqueadas por inibidores da ciclo-oxigenase ou 5-lipoxigenase e antagonistas de leucotrieno B₄ (LTB₄), que inibem o edema de pele induzido por TPA (FURSTENBERGER et al., 1994; PUIGNERO; QUERALT, 1997; RAO et al., 1993; RAO et al., 1994).

EHJ50 e EHJ70 reduziram o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de Cróton independente da dose, demonstrando efeito anti-inflamatório tópico. Como observado na Tabela 15 constante à página 109, a redução do edema foi mais significativa ($p < 0,001$) após 24 horas de tratamento. Esta ação antiedematogênica pode ser devida à redução da permeabilidade vascular, uma vez que ocorreu diminuição da vasodilatação e do infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, conforme evidenciado nas análises histopatológicas (Figura 43, página 115). Além disso, a redução das enzimas MPO e NAG também corroboraram estes resultados, uma vez que MPO é frequentemente associada à presença de leucócitos polimorfonucleares (BRADLEY et al., 1982), enquanto NAG é indicativa de leucócitos mononucleares no sítio da inflamação, principalmente em processos inflamatórios crônicos (SANCHEZ; MORENO, 1999). Considerando o estresse oxidativo induzido pelo óleo de Cróton, a presença de flavonoides (constituintes polifenólicos) nos extratos pode justificar o efeito anti-inflamatório tópico, uma vez que enzimas (ciclo-oxigenase ou lipoxigenase) envolvidas na via do ácido araquidônico podem ser inibidas por esses polifenóis (DZIALO et al., 2016).

A capacidade de EHJ50 e EHJ70 inibir o edema induzido pelo fenol demonstra a possível eficácia desses extratos no tratamento da dermatite de contato (LIM; PARK; KIM, 2004). Neste modelo, as membranas dos queratinócitos são rompidas por contato direto com o fenol, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, fatores de crescimento incluindo interleucina-1 α (IL-1 α), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-3, IL-6 e IL-8, mediados por proteína quinase C (LIM; PARK; KIM, 2004; MO et al., 2014; WILMER et al., 1994). As citocinas pró-inflamatórias são induzidas neste modelo por um mecanismo distinto daquele observado no de inflamação cutânea induzido pelo óleo de Cróton, onde a indução das citocinas ocorre via ligação à receptores específicos, através de vias dependentes da PKC, nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear (WILMER et al., 1994). Os extratos hidroetanólicos inibiram com maior eficácia o edema quando comparados à dexametasona (controle positivo) demonstrando, dessa maneira, uma possível eficácia no tratamento da dermatite de contato.

A histamina causa vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular, promovendo uma resposta edematogênica em poucos minutos (BRAND et al., 2002). Além dessas ações, esta substância ainda estimula fibras nervosas sensitivas através de mecanismos dependentes dos receptores H1, que resulta em prurido. Uma das principais funções fisiopatológicas da histamina é a sua ação como mediadora das reações de hipersensibilidade do tipo I, como a urticária (BRAND et al., 2002; RANG et al., 2007). A aplicação tópica de EHJ50 e EHJ70 não promoveu redução do edema, demonstrando que o mecanismo anti-inflamatório desses extratos não está associado à inibição da via da histamina.

Considerando os aspectos relacionados ao efeito anti-inflamatório, os resultados sugerem que EHJ50 e EHJ70 podem exercer ação anti-inflamatória por atuarem direta e/ou indiretamente nas vias do ácido araquidônico (AA) e estresse oxidativo. Esses mecanismos podem ser apoiados pela presença de flavonoides, que atuam na modulação das enzimas fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipoxigenase e da enzima produtora de óxido nítrico (ON), óxido nítrico sintase (ONS), com redução da produção de AA, PG, LT e ON, mediadores cruciais no processo de inflamação.

A diminuição da vasodilatação por EHJ50 e EHJ70 foi também confirmada pelo ensaio do ON. O ON, gerado pela ação da enzima ONS induzida, contribui para a permeabilidade endotelial, o que resulta em infiltração celular e extravasamento de plasma e proteínas plasmáticas para os tecidos, favorecendo a formação do edema e

processo inflamatório. Adicionalmente, a exposição de leucócitos ao ON promove o aumento da produção de interleucina-8 (IL-8) e TNF- α , reforçando o gradiente quimiotático no tecido danificado (CORRIVEAU et al., 1998). Os resultados obtidos mostraram que EHJ50 e EHJ70 reduziram a produção de ON, IL-6 e TNF- α , confirmando o efeito anti-inflamatório dos métodos aplicados neste estudo e que esses extratos possuem componentes que são capazes de bloquear, pelo menos, uma das vias desses mediadores da inflamação.

Assim como os flavonoides, outro metabólito com atividade anti-inflamatória já foi detectado em *K. brasiliensis*, fundamentando os resultados obtidos nos experimentos realizados. O complexo kalanchosine e ácido málico descrito por Costa e colaboradores (2006) demonstrou um efeito anti-inflamatório sobre o edema induzido pelo agente flogístico *zymosan*, na qual o sal produziu uma resposta aproximadamente duas vezes mais ativo do que o suco (COSTA et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os extratos das folhas de *K. brasiliensis* apresentam atividade anti-inflamatória tópica sobre o edema induzido por óleo de Cróton e fenol. No entanto, investigações adicionais são necessárias para uma melhor elucidação dos mecanismos de ação pelo qual esta planta exerce seu efeito, garantindo a segurança de seu uso medicinal.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi possível obter a seguinte conclusão:

- *Kalanchoe brasiliensis* é uma fonte natural de substâncias com atividade antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica, evidenciando essa espécie vegetal como potencial alvo para o desenvolvimento de formulações e formas fitoterápicas.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 287, p. 394-400, 2007.

ALAM, Md. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research Journal**, v. 36, p. 697-705, 2005.

ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. CARVALHO, J. C. T. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmed, 2004.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2007. 776 p.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

AMIGÓ, M.; PAYÁ, M.; DE ROSA, S.; TERCENIO, M.C. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappa B activation in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 353-365, 2007.

ANSARI, S. H.; ISLAM, F.; SAMEEM, M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: a review. **Journal of Advance Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, p. 142-146, 2012.

ANTUNES-RICARDO, M.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; MARTÍNEZ-VITELA, C.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Topical anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *opuntia ficus indica*. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M., LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R. DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORUAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

AVIOR, Y.; BOMZE, D.; RAMON, O.; NAHMIA, Y. Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. **Food & Function**, v. 4, p. 831-844, 2013.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BALOURI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BARRIERE, S. L. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, p. 151-153, 2005.

BECKER, P.F.L. Inflamação. In: **Patologia Geral**, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BIODIVERSIDADE BRASILEIRA disponível em: <http://www.sibbr.gov.br/areas/>. Acessado em 18 de dezembro de 2016.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-2000. 1958.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 3-14, 2001.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BOUÉ, M. S.; CARTER-WIENTJES, H. C.; SHIH, Y. B.; CLEVELAND, E. T. Identification of flavones aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 991, p. 61-68, 2003.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v. 51, p. 283-289, 2002.

BRASIL. Congresso Nacional. LEI n° 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999 - Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo. Brasília: Congresso Nacional, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Ministério da saúde. PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2014.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 902-908, 2007.

BURT, S. Essential oil: their antibacterial properties and potential application in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 314-319, 2008.

CECHINEL, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CESAMA 2013. Companhia de Saneamento Municipal - Hidrografia em Juiz de Fora. Disponível em: <http://www.cesama.com.br/?pagina=hidrografia>. Acessado em abril 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH• assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414 - 420, 2013.

CHIBLI, L. A.; RODRIGUES, K. C. M.; GASPARETTO, C. M.; PINTO, N. C. C.; FABRI, R. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 330-338, 2014.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2684-2691, 2011.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R. D. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 144-151, 2008.

CORRIVEAU, C. C.; MADARA, P. J.; VAN DERVORT, A. L.; TROPEA, M. M.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. **The Journal of Infectious Disease**, v. 177, p. 116-126, 1998.

COSTA, A. C. O.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES, J. M.; THEMÍSTOCLES, N. N. S.; MENDONÇA, J. N.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; ALBERTO, L.; SOARES, L. Quantification of chemical marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) leaves by HPLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 795-800, 2014.

- COSTA, S. S.; JOSSANG, A.; BODO, B.; SOUZA, M. L. M.; MORAES, V. L. G. Patuletin acetyl rhamnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1503-1510, 1994.
- COSTA, S. S.; DE SOUZA, M. L.; IBRAHIM, T.; MELO, G.O.; ALMEIDA, A. P.; GUETTE, C.; FÉRÉZOU, J.P.; KOATZ, V. L. Kalanchosine dimalate, an anti-inflammatory salt from *Kalanchoe brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 815-818, 2006.
- COSTA, T. M., MORGADO, P. G. M., CAVALCANTE, F. S., DAMASCO, A. P., NOUÉR, S. A., SANTOS, K. R. N. Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. **PLoS One**, v. 11, p. e0160506, 2016.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- CRUZ, B. P.; CHEDIER, L. M.; FABRI, R. L.; PIMENTA, D. S. Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers under light and temperature levels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1435-1441, 2011.
- CRUZ, B. P.; CHEDIER, L. M.; PEIXOTO, P. H. P.; FABRI, R. L.; PIMENTA, D. S. Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 211-217, 2012.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 243-248, 2005.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DZIAŁO, M.; MIERZIAK, J.; KORZUN U.; PREISNER, M.; SZOPA, J.; KULMA, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, p. 1-41, 2016.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.; LUZ, N. N. N.; BEZERRA, M. Z. B.; TREVISAN, M. T. S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 783-789, 2011.

FERGUSON, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutation Research**, v. 690, p. 3-11, 2010.

FERNANDES, J. M.; FÉLIX-SILVA, J.; DA CUNHA, L. M.; GOMES, J. A.; SIQUEIRA, E. M.; GIMENES, L. P.; LOPES, N. P.; SOARES, L. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ZUCOLOTTO, S. M. 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, p. e0168658, 2016.

FERREIRA, A. C.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 417-421, 2000.

FIRESTEIN, G. S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. In: GOLDMAN, L. ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22^a ed., 2004. p. 227

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1035-1040, 1999.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p. 239-243, 1912.

FONSECA, F. V.; SILVA J.; PEREIRA G. P.; DANTAS-BARROS A. M.; MELO, M. M. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatu*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 26-29, 2004.

FORTES, T. O.; ALVIANO, D. S.; TUPINAMBÁ, G.; PADRÓN, T. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO C. S.; SELDIN L. Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. **Microbiological Research**, v. 163, p. 200-207, 2008.

FRIMPONG-MANSO,S.; ASIEDU-GYEKYE, I. J.; NAADU, J. P.; MAGNUS-ARYITEY,G. T.; NYARKO, A. K.; BOAMAH,D.; AWAN, M. Micro and macro element composition of *Kalanchoe integra* leaves: an adjuvant treatment for hypertension in Ghana. **International Journal of Hypertension**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

FURSTENBERGER, G.; CSUK-GLANZER, B. I.; MARKS, F.; KEPPLER, D. Phorbol ester-induced eukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2823-2827, 1994.

GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-137, 2003.

GÁBOR, M.; RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Action**, v. 36, p. 1-4, 1992.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO, R. *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143-149, 2004.

GEHRIG, H.; GAUBMANN, O.; MARX, H.; SCHWARZOTT, D.; KLUGE, M. Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) inferred from nucleotide sequences of the ITS-1 and ITS-2 regions. **Plant Science**, v. 160, p. 827-835, 2001.

GEYDAN, T. D.; MELGAREJO, L. M. Metabolismo ácido de las crasuláceas. **Acta Biológica Colombiana**, v. 10, p. 3-15, 2005.

GOBBO-NETO, I.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HARLALKA, G. V.; PATIL, C. R.; PATIL, M. R. Protective effect of *Kalanchoe pinnata* Pers. (Crassulaceae) on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 201-205, 2007.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytotherapy**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HSIEH, Y. J.; HUANG, H. S.; LEU, Y. L.; PENG, K. C.; CHANG, C. J.; CHANG, M. Y. Anticancer activity of *Kalanchoe tubiflora* extract against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Environmental Toxicology**, v.15, p. 1-11, 2015.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, p. 97-108, 2008.

IBRAHIM, T.; CUNHA, J. M.; MADI, K.; FONSECA, L. M.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L. G. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 875-883, 2002.

JARDINI, F. A.; MANCINI, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 137-147, 2007.

JONES, Q. R. D.; WARFORD, J.; RUPASINGHE, H. P. V.; ROBERTSON, G. S. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, p. 1-9, 2012.

KAST, R.; FURSTENBERGER, G.; MARKS, F. Phorbol ester TPA- and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 567-572, 1993.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDA, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217-233, 2011.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plant and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, p. 1479-1491, 2010.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Effects of an antiinflammatory peptide (antiflammin-2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, p. 347-353, 1995.

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

LUCAS, V.; MACHADO, O. Contribuição ao estudo das plantas medicinais brasileira: saião - farms. **Revista da Flora Medicinal**, v. 2, p. 77-118, 1946.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, p. 33-39, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MEDEIROS, G. C. R.; WANDERLEY, A. G. Validação farmacológica da atividade antiúlcera do extrato seco de *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae). In: **XVII Congresso de Iniciação Científica, número. I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**. Recife, outubro de 2009.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 193-201, 2008.

MELO, M. S. O. M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, p.147-157, 1989.

MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A. N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p. 86-104, 2014.

MILLER, H. M. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 45, p. 91, 1971.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MO, J., PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; SONGKRO, S.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory potential of standardized pomegranate rind extract and ellagic acid in contact dermatitis. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 629-632, 2014.

MORAES, V. L. G.; SANTOS, L. F. M.; CASTRO, S. B. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of *Kalanchoe*, *Alternanthera*, *Paullinea*, and *Mikania* species. **Phytomedicine**, v. 1, p. 199-204, 1994.

MORT, M. E.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from matk sequence data. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 76-91, 2001.

MOURÃO, R. H.; SANTOS, F. O.; FRANZOTTI, E. M.; MORENO, M. P.; ANTONIOLLI, A. R. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD₅₀) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Camb.) leaves picked before and during blooming. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 352-354, 1999.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, R. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kalanchoe+laciniata>. Acessado em 02 de março de 2016.

NGUELEFACK, T. B.; NANA, P.; ATSAMO, A. D.; DIMO, T.; WATCHO, P.; DONGMO, A. B.; TAPONDJOU, L. A.; NJAMEN, D.; WANSI, S. L.; KAMANYI, A. Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 70-75, 2006.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. G.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

PACHECO, N. R.; PINTO, N. C. C.; SILVA, J. M.; MENDES, R. F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. *Cecropia pachystachya*: a species with expressive *in vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant effects. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

PAIVA, L. S.; HAYASHI, E. A.; MELO, G. O.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L.; NOBREGA, A. Inhibition of B cell development by kalanchosine dimalate. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 828-835, 2008a.

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

PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A. F.; CALIXTO, J. B.; PIANOWSKI, L. F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, p. 413 - 420. 2013.

PATRICK, E.; BURKHALTER, A.; MAIBACH, H. I. Recent investigations of mechanisms of chemically induced skin irritation in laboratory mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 88, p. 24-31. 1987.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combating bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, p. 5286-5298, 2015.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, p. 75-100, 2009.

PHANSE, M. A.; PATIL, M. J.; CHAUDHARI, K. A. P. D.; PATEL, B. *In-vivo* and *in-vitro* screening of medicinal plants for their anti-inflammatory activity: an overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 9-33, 2012.

PINTO, N. C. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; GAMEIRO, J.; CHEDIER, L. M.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337, 2015.

PIZZIOLO, V. R.; BRASILEIRO, B. G.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 98-109, 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. **Inflammation**, v. 21, p. 431-442, 1997.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

RAO, T. S.; YU, S. S.; DJURIC, S. W.; ISAKSON, P. C. Phorbol ester induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 10, p. 213-228, 1994.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR RAVI, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

REDONDO, P.; GARCIA-FONCILLAS, J.; ESPANA, A.; CUEVILLAS, F.; QUINTANILLA E. Differential modulation of IL-8 and TNF alpha expression in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 186-194, 1997.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31 - 63, 2006.

ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H.; Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, p. 402-408, 2007.

ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 49, p. 395-401, 1997.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of prostaglandin-H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators Journal**, v.57, p. 119-131, 1999.

SANTANA, G. D. J. **Investigação da atividade antibacteriana do extrato de lavagem foliar e do glaucolídeo A de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2015. 110f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SANTHOSH, R. S.; SURIYANARAYANAN, B. Plants: a source for new antimycobacterial drugs. **Planta Medica**, v. 80, p. 9-21, 2014.

SARKAR, R.; MONDAL, C.; BERA, R.; CHAKRABORTY, S.; BARIK, R.; ROY, P.; KUMAR, A.; YADAV, K. K.; CHOUDHURY, J.; CHAUDHARY, S. K.; SAMANTA, S. K.; KARMAKAR, S.; DAS, S.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, J.; SEN, T. Antimicrobial properties of *Kalanchoe blossfeldiana*: a focus on drug resistance with particular reference to quorum sensing mediated bacterial biofilm formation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 951-962, 2015.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Anti-inflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

SCHEIBMEIR, H. D.; PIERCE, J. D.; CHRISTENSEN, K.; WHITAKER, S. H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 21, p. 24-28, 2005.

SCHOLZ, K.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K.; MARKS, F. Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 309, p. 263-269, 1995.

SEO, J.; LEE, S.; ELAM, M. L.; JOHNSON, S. A.; KANG, J.; ARJMANDI, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leave (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 174-180, 2014.

SHELDON, A. T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, v. 18, p. 170-180, 2005.

SILVA, G. L.; LUFT, C.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; MELO, D. A. S.; DONADIO, M. V. F.; NUNES, F. B.; AZMBUJA, M. S.; SANTANA, J. S.; MORAES, C. M. B.; MELLO, R. O.; CASSEL, E.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. R. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1397-1408, 2015.

SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 790-794, 2009.

SILVA, O. A.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Potencial antioxidante *in vitro* do (-)- α -terpineol. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, p. 140-152, 2012.

SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; MENDONÇA, S. C. F. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 60, p. 201-210, 1995.

SMITH, G. *Kalanchoe* species poisoning in pets. **Veterinary Medicine**, v. 2004, p. 933-936, 2004.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H.T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 683-689, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T.; CITÓ, M. C.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M.; FONTELES, M. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

STALIKAS, C. D. Review: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TEMPONI, V. S. **Investigação química e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

THE PLANT LIST disponível em:

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Crassulaceae/>. Acessado em 29 de fevereiro de 2016.

THE PLANT LIST disponível em: <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/tro-8902741>. Acessado em 01 de março de 2016.

THE PLANT LIST disponível em:

<http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=244990>. Acessado em 02 de março de 2016.

THE CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY disponível em: http://cddep.org/blog/posts/recent_fda_antibiotic_approvals_good_news_and_bad_news#sthash.UWqHNZrs.dpbs. Acessado em 14 de janeiro de 2017.

THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=244990>. Acessado em 09 de novembro de 2015.

TIBA, C. Atlas Solarimétrico do Brasil: banco de dados solarimétricos. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2000. 111 p.

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

TROPICOS disponível em:

<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=8902740>. Acessado em 1 de março de 2016.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593-606, 2007.

UNION EUROPEA. NATURA 2000 EN LA REGIÓN MACARONÉSICA. Bélgica. 2010.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

WANG, H. Q.; KIM, M. P.; TIANO, H. F.; LANGENBACH, R.; SMART, R. C. Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A(2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WERZ, O.; KLEMM, J.; SAMUELSSON, B.; RADMARK, O. Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. **Blood Journal**, v. 97, p. 2487-2495, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Traditional Medicine Strategy 2014 - 2023.CHINA, 2013.

WILKINSON, J. M. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Eds). **Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 157-171.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical - induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 915-922, 1994.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4055-4061, 2011.

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

YANISHLIEVA, N. VI.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, p. 377-382, 1995.

YI, L.; YUAN, D.; LIANG, Y.; XIE, P.; ZHAO, Y. Fingerprinting alterations of secondary metabolites of tangerine peels during growth by HPLC-DAD and chemometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 43-51, 2009.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, Protocolo nº 005/2016



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

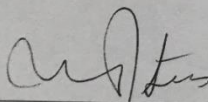
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 005/2016 – CEUA sobre “Atividade anti-inflamatória de produtos naturais” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ORLANDO VIEIRA DE SOUSA com a colaboração de MARIA SILVANA ALVES e OSCAR ALEJANDRO SANTOS MAYORGA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 480 camundongos da linhagem Swiss (480 machos) de 36 a 40 dias conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/09/2016 a 31/08/2019.

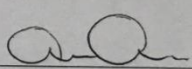
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 005/2016 - CEUA about “Atividade anti-inflamatória de produtos naturais” under responsibility of Orlando Vieira de Sousa and collaboration of MARIA SILVANA ALVES and OSCAR ALEJANDRO SANTOS MAYORGA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (480 males) of 36 to 40 days of age, will be delivered as requested in the period of 01/09/2016 to 31/08/2019.

Juiz de Fora, 09 de agosto de 2016



Coordenadora
CEUA



Vice-coordenadora
CEUA

ANEXO B - *Conference Paper* intitulado "Chemical characterization and *in vitro* antibacterial activity of *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. (Crassulaceae)", publicada na **Planta Medica**, v. 81, n. S01, p. S366-S367, 2016. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1596480>.

Planta Med 2016; 81(S 01): S1-S381

DOI: 10.1055/s-0036-1596480

Abstracts

Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

Chemical characterization and *in vitro* antibacterial activity of *Kalanchoe brasiliensis* Cambess (Crassulaceae)

OAS Mayorga¹, JR Florencio¹, JDG de Santana¹, C Feres-Netto², DM Pedrosa², YFG Costa², NCC Pinto³, E Scio³, OV Sousa⁴, MS Alves⁴

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, São Pedro, CEP 36036 – 900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

²Pharmacy Course, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, São Pedro, CEP 36036 – 900, Juiz de Fora, Brazil

³Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Federal University of Juiz de Fora, 36036 – 900, Juiz de Fora, MG, Brazil

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, São Pedro, CEP 36036 – 900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Kalanchoe brasiliensis Cambess (Crassulaceae), popularly known as "Saião", is a Brazilian medicinal plant distributed from Bahia to São Paulo and traditionally used to treat injuries, abscesses, enlarged ganglia and inflammatory processes [1,2]. The current study aimed to characterize the chemical composition of the ethanolic extract 50% (v/v) obtained from *K. brasiliensis* leaves collected before blooming using HPLC-DAD [3] and to investigate the antibacterial activity of this extract at different concentrations (30%, 50% and 70%). The chromatography profile and the UV spectrum analysis suggested the significant presence of flavonoids. The antibacterial activity was established according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) [4] using the microdilution method followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), which allows to classify the antibacterial effect as bacteriostatic or bactericidal [5]. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC[®] 29213TM), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC[®] 6538TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 27853TM), *Escherichia coli* (ATCC[®]25922TM), *Escherichia coli* (ATCC[®]10536TM), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC[®] 13311TM) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC[®] 10708TM) were used as reference strains. The ethanolic extract at 30% and 50% demonstrated bacteriostatic effect against *S. Typhimurium* ATCC[®] 13311TM and *S. Choleraesuis* ATCC[®] 10708TM, with MIC values of 5000 µg/mL. Additionally, the ethanolic extract at 70% revealed bacteriostatic effect against *S. aureus* ATCC[®] 6538TM and ATCC[®]25922TM and against *S. Thyphimurium* ATCC[®] 13311TM and *S. Choleraesuis* ATCC[®] 10708TM, with MIC values of 5000 µg/mL, showing a broad spectrum of action. These results suggest that *K. brasiliensis* can be an interesting source of bioactive molecules with antibacterial potential.

Acknowledgements: This investigation was supported by UFJF, FAPEMIG, CAPES, OEA and GCUB.

Keywords: *Kalanchoe brasiliensis*, flavonoids, HPLC-DAD, anti-bacterial agents, medicinal plants.

References:

- [1] Costa SS, Jossang A, Bodo B, Souza ML, Moraes VL. Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *J Nat Prod* 1994; 57: 1503 – 1510
- [2] Mourão RH, Santos FO, Franzotti EM, Moreno MP, Antonioli AR. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD₅₀) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Camb.) leaves picked before and during blooming. *Phytother Res* 1999; 13: 352 – 354.
- [3] Costa ACO, Fernandes JM, Themístocles NNS, Mendonça JN, Tomaz JC, Lopes NP, Alberto L, Soares L, Zucolotto SM. Quantification of chemical marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) leaves by HPLC-DAD. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2015, 38: 795 – 800
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition (M07-A9)*. Wayne: CLSI, 2012
- [5] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 5 – 16

No conflict of interest has been declared by the author(s).

ANEXO C - *Conference Paper* intitolado "*Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae): an interesting source of bioactive substances to treat infectious diseases caused by *Salmonella* strains", publicada na **PharmacologyOnLine**, v. 1, Supplementary Issues, p. 241-241, 2016.

 PharmacologyOnLine

2016 - Supplementary Issue - vol. 1

 SILAE
2016

25° SILAE CONGRESS

"Paolo Ruffini"

11th - 15th September 2016
Modena, Italy

Abstract Book

 SILAE

PP2_63

KALANCHOE BRASILIENSIS CAMB. (CRASSULACEAE): AN INTERESTING SOURCE OF BIOACTIVE SUBSTANCES TO TREAT INFECTIOUS DISEASES CAUSED BY SALMONELLA STRAINS

**Mayorga OAS.¹, Florencio JR.¹, Feres-Netto C.², Pedrosa DM.², Costa YFG.², Pinto NCC.³, Scio E.³,
Sousa OV.⁴, Alves MS.⁴**

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-Brazil; ² Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-Brazil;

³ Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-Brazil; ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-Brazil

email: silvana.alves@uff.edu.br

Kalanchoe brasiliensis Camb. (Crassulaceae) is a Brazilian vegetal species popularly known as "saião" and "courama branca" traditionally used to treat injuries, abscesses, enlarged ganglia and inflammatory processes (Costa et al., 1994; Mourão et al., 1999). However, there are few reports about the pharmacological activities of this medicinal plant, mainly about its possible antibacterial activity. The current study was designed to explore the chemical composition and the antibacterial activity against *Salmonella* reference and routine strains of hydroethanolic extracts (HEE) obtained from fresh leaves of *K. brasiliensis* collected before blooming, using three different concentrations of ethanol [30% (HEE230), 50% (HEE250) and 70% (HEE270) v/v].

The chemical characterization was established by reverse phase HPLC-DAD. The antibacterial activity was assessed by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using microdilution method followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), which allows the classification of the antibacterial effect as bacteriostatic or bactericidal (Andrews, 2001; CLSI, 2012). Two reference strains *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC® 10708™) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC® 13311™) and five routine strains *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 1406591, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 1418594, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 1628260, *Salmonella* spp. 1266695 and *Salmonella* spp. 1507788 isolated from clinical human specimens were tested.

UV spectra obtained from chromatographic analysis suggested the presence of the same six flavonols in HEE230, HEE250 and HEE270. Considering the antibacterial activity, HEE230 and HEE250 were active against *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) and *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™), with MIC values of 5000 µg/mL and bacteriostatic effect. However, HEE270 inhibited all *Salmonella* strains tested, with MIC values of 5000 µg/mL and bacteriostatic effect, being the most active extract among those investigated. These results indicate that *K. brasiliensis* is an interesting source of bioactive substances, being effective against *Salmonella* strains, including antibiotic-resistant ones.

Acknowledgments: This investigation was supported by UFJF, FAPEMIG (CDS-APQ-04680-10), CAPES, and PAEC OEA-GCUB.

1. Costa, S. S.; Jossang, A.; Bodo, B.; Souza, M. L.; Moraes, V. L. Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *Journal of Natural Products*, 57:1503-1510, 1994.
2. Mourão, R. H.; Santos, F. O.; Franzotti, E. M.; Moreno, M. P.; Antonioli, A. R. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD₅₀) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Camb.) leaves picked before and during blooming. *Phytotherapy Research*, 13:352-354, 1999.
3. Andrews J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:5-16, 2001.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard - Ninth Edition (M07-A9). Wayne: CLSI, 2012.

ANEXO D - Resumo intitulado "*In vitro* antibacterial activity of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae) against *Staphylococcus aureus*" apresentado e publicado nos Anais do VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, SC, Brasil



VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais
III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer
Itajaí, SC, Brasil, 24 a 27 de outubro de 2016



IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Kalanchoe brasiliensis* CAMB. (CRASSULACEAE) AGAINST *Staphylococcus aureus*

*Mayorqa OAS*¹, *Florencio JR*¹, *Ferreira ADP*², *Sousa OV*¹, *Alves MS*¹

Introduction: *Staphylococcus aureus*, mainly methicillin resistant strains (MRSA), remains an important human pathogen and has been increasing as a serious nosocomial and community microorganism with the ability of multidrug resistance. Several researchers are exploring the diversity of plant species able to treat these agents. *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae), popularly known as "saião", is traditionally used in Brazil to treat injuries, abscesses, enlarged ganglia and inflammatory processes. However, there are few reports about its possible antibacterial activity. **Objective:** This study was designed to explore the *in vitro* antibacterial activity of hydroethanolic extract (HEE) at three different concentrations [30% (HEE230), 50% (HEE250) and 70% (HEE270) v/v] obtained from fresh leaves of *K. brasiliensis* collected before blooming against two *S. aureus* reference strains and five MRSA routine strains. **Method:** The antibacterial activity was assessed by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using microdilution method followed by the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), classifying the antibacterial effect as bacteriostatic or bactericidal. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC®29213™ and ATCC®6538™) and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 1485279, 1605677, 1664534, 1688441 and 1830466 clinical strains were tested. **Results and Conclusion:** HEE230 and HEE250 were inactive against all the strains tested. However, HEE270 inhibited *S. aureus* ATCC®6538™ and *S. aureus* 1605677 and 1830466 clinical strains, with MIC values of 5 mg/mL and bacteriostatic effect. These results indicate that further antibacterial activity studies of *K. brasiliensis* may contribute to its utilization as a source of bioactive antibacterial substances, despite its discreet activity against *S. aureus* strains.

Acknowledgements: UFJF, FAPEMIG, CAPES and PAEC OEA-GCUB.

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, oscarsantos_7@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, alucia@hucff.uffj.br