



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ADRIELE MAYARA DA SILVA SOARES

PROPRIEDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *KALANCHOE*
***PINNATA* PODE ESTAR ASSOCIADA À INIBIÇÃO**
NITRÉRGICA E A AÇÃO ANTIOXIDANTE.

Santarém – PA
2017

ADRIELE MAYARA DA SILVA SOARES

**PROPRIEDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE KALANCHOE
PINNATA PODE ESTAR ASSOCIADA À INIBIÇÃO
NITRÉRGICA E A AÇÃO ANTIOXIDANTE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço
Diniz

Santarém – PA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S676p Soares, Adriele Mayara da Silva
Propriedade anti-inflamatória de *Kalanchoe pinnata* pode estar associada à inibição nitrérgica e a ação antioxidante. / Adriele Mayara da Silva Soares. – Santarém, 2017.
79 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. *Kalanchoe pinnata*. 2. Flavonoides. 3. Estudo fitoquímico. I. Diniz, Domingos Luiz Wanderley Picanço, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

1

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2 No dia quatro de dezembro do ano de dois mil e dezessete foi realizada a
3 defesa de mestrado da dissertação intitulada “**PROPRIEDADE ANTINFLA-**
4 **MATÓRIA DE Kalanchoe pinnata PODE ESTAR ASSOCIADA À INIBIÇÃO**
5 **NITRÉRGICA E A SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES**”, da aluna **Adriele**
6 **Mayara da Silva Soares**, devidamente matriculada no Programa de Pós-
7 Graduação em Biociências – PPGBiociências. A banca examinadora estava
8 composta pelos professores doutores Guilherme Augusto Barros Conde e
9 Siany da Silva Liberal, mediação realizada pelo professor doutor Domingos
10 Luiz Wanderley Picanço Diniz (orientador). A apresentação teve início às
11 10:20 e finalização às 11:00. Após o término da apresentação foi rea-
12 lizada a arguição pelos devidos membros examinadores. A sessão foi finali-
13 zada às 12:00 após a divulgação do resultado da defesa de dissertação
14 de mestrado na qual a aluna foi **APROVADA**, condicionada a entregar no
15 prazo de 30 dias a versão corrigida da dissertação. Para efeito legal segue a
16 presente ata assinada pelo professor orientador da dissertação apresentada,
17 pelo mestrando e pelos professores avaliadores.

Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz (orientador)

Prof. Dr. Guilherme Augusto Barros Conde

Profa. Dra. Siany da Silva Liberal

Adriele Mayara da Silva Soares

A Deus, que em sua infinita sabedoria guia meus caminhos me proporcionando saúde, serenidade e disposição para enfrentar todas as etapas desta árdua caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade que me deu de realizar este presente trabalho, aos meus pais Silvana Soares e Afonso Soares as minhas irmãs Adriene e Adriana Soares pelo total apoio e dedicação nessa jornada na conclusão deste curso superior.

Ao Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderly Picanço Diniz, pelos ensinamentos e pela total confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho, ao Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos, pelos ensinamentos e pela disponibilidade do seu laboratório durante a realização deste trabalho;

Ao meu amigo e marido Igor Miranda, aos meus colegas de laboratório: Fabiane Trindade, Karla, Melquiades de Oliveira, Ernelison Angly agradeço pela colaboração, e momentos de descontração, pela troca de experiência que foram preciosos para o nosso aprendizado e crescimento.

Aos meus orientandos do projeto PAI, Evanilson, Cleomara, Fabiane, Edinelma, agradeço pela colaboração, e momentos de descontração, pela troca de experiência que foram preciosos para o nosso aprendizado e crescimento.

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

“Mares calmos não fazem um bom marinheiro”

Autor desconhecido.

RESUMO

Kalanchoe pinnata (Lam.) Persson (Crassulaceae), conhecida como “folha-da-fortuna”, tem sido largamente utilizada na medicina tradicional, principalmente para o tratamento de inflamações, infecções, feridas, ulcerações e gastrite. O objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar constituintes bioativos, bem como avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica das folhas de *K. pinnata*. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com metanol seguida de obtenção, por partição, das frações hexânica, diclorometânica, e acetato de etila. Constituintes do extrato metanólico e das frações foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta e cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Uma metodologia qualitativa e específica foi utilizada para a detecção de cada grupo químico. O efeito anti-inflamatório foi avaliado pelo modelo de bolsa de ar induzido por carragenina, conforme Vinegar *et al.* (1973). No estudo fitoquímico identificou-se a presença de taninos, flavonoides e glicosídeos cardiotônicos. Na bolsa de ar foi verificado que na dose de 400 mg/kg promoveu uma redução significativa do volume do exsudato inflamatório comparada com o controle. No entanto, não conseguiu inibir a migração leucocitária. O grupo tratado com dexametasona apenas reduziu o volume de exsudato. Desta forma, os resultados indicam que a planta *Kalanchoe pinnata* podem ser uma fonte de novos compostos químicos com atividades anti-inflamatórias.

Palavras-chave: *Kalanchoe pinnata*. Flavonoides. Estudo Fitoquímico. Atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

Kalanchoe pinnata (Lam.) Persson (Crassulaceae), known as "leaf of fortune", has been widely used in traditional medicine, mainly for the treatment of inflammations, infections, wounds, ulcerations and gastritis. The objective of the present study was to identify and quantify bioactive constituents, as well as to evaluate the antioxidant, antibacterial and topical anti-inflammatory activities of the *K. pinnata* leaves. The dried and pulverized vegetable material was subjected to maceration with methanol followed by partitioning of hexane dichloromethane fractions into ethyl acetate. Constituents of the methanolic extract and fractions were identified by high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector and gas chromatography coupled to mass spectrometry in addition to chromatographic column. A qualitative and specific methodology was used for the detection of each chemical group. The anti-inflammatory effect was evaluated by carrageenan-induced air bag model, according to Vinegar et al. (1973). In the phytochemical study the presence of tannins, flavonoids and cardiotoxic glycosides was identified. In the air pocket it was verified that at the dose of 400 mg / kg promoted a significant reduction in the volume of the inflammatory exudate compared to the control. However, it failed to inhibit leukocyte migration. The dexamethasone treated group only reduced the volume of exudate. In this way, the results indicate that the plant *Kalanchoe pinnata* can be a source of new chemical compounds with anti-inflammatory activities.

Key words: *Kalanchoe pinnata*. Flavonoids. Phytochemical study. Anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas Básicas dos Flavonoides e suas Subclasses.....	20
Figura 2 - Desenho Esquemático do Protocolo da Gaiola Metabólica. Fonte Leonia Oliveira.	36
Figura 3 - Gaiola Metabólica. Fonte: Leonia Oliveira	36
Figura 4 - Fluxograma da Obtenção dos Extratos do Material Vegetal da Planta Kalanchoe Pinnata. Fonte: Autor(2017).....	38
Figura 5 - Efeito do Extrato Aquoso de Kalanchoe Pinnata (I.P) Administrado 1h Antes da Carragenina (Cg) 1% Sobre os Níveis de Leucócitos no Modelo de Bolsa de Ar Induzida pela Cg em Ratos. Dados Representados Por Média + Epm (N=3). *P<0,05; **P<0,01	44
Figura 6 - Efeito do Extrato Aquoso de Kalanchoe Pinnata (I.P) Sobre os Níveis de Exsudação No Modelo de Bolsa de Ar Induzida pela Cg Em Ratos. 0 – Carragenina (1%) Somente. Dx (Dexametasona - 600 Mg/Kg, I.P. + Cg (1%). Dados Representados Por Média + Epm (N=3). *P<0,05; **P<0,01	475
Figura 7 - Efeito de Kalanchoe Pinnata sobre a Produção de Nitrito no Exsudato Inflamatório. Efeitos do Extrato de Kalanchoe Pinnata (I.P Sobre A Concentração de Nitrito no Exsudato em Bolsas De Ar de Ratos Tratados com Carragenina (1%). Dados Representados Por Média + Epm (N=3). *P<0,05; **P<0,01	46
Figura 8- Efeito da Kalanchoe Pinnata sobre o Acúmulo de Exsudato Induzido pela Injeção de Carragenina (Cg) Em Ratos Wistar, Machos (180-220 G) Em Duas Vias de Administração. Cada Ponto Representa o Volume Médio de Exsudato \pm Epm * P< 0,001 E # P< 0,01, Comparando com o Grupo Controle	50
Figura 9- Contagem Global de Leucócitos no Exsudato Inflamatório de Ratos, 16 Horas Após A Injeção de Carragenina. Houve Diferenças Significativas em Comparação ao Controle (Carragenina + Solução Salina), Obtido por meio da Anova, Teste de Tukey, P> 0,05.....	51
Figura 10- Gráfico de Diâmetro Médio das Partículas.....	513
Figura 11- Perfis cromatográficos do extrato acetato das folhas de K. pinnata por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	527
Figura 12 - Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma do extrato acetato e do padrão químico Canferol	58
Figura 13 - Perfis cromatográficos do extrato metanólico das folhas de K. pinnata por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas	59

Figura 14 - Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma do extrato acetato e do padrão químico Canferol.	61
Figura 15 - Perfis cromatográficos do extrato diclometano das folhas de <i>K. pinnata</i> por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas	62
Figura 16 - Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de <i>K. pinnata</i> obtido por CGEM.....	63
Figura 17 - Espectros de massas da β -amirina do banco de dados (A) e do pico no qual ela foi identificada na amostra (B)	65
Figura 18 - Espectros de massas da α -amirina do banco de dados (A) e do pico no qual ela foi identificada na amostra (B).	65
Figura 19 - Fórmulas Estruturais da A-Amirina e B-Amirina.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diversas Classes e Substâncias os quais já Foram Isoladas.....	19
Tabela 2 - Flavonoides Isolados e Identificados para a Espécie <i>K. Pinnata</i>	22
Tabela 3- Efeito da <i>Kalanchoe Pinnata</i> sobre os Níveis Plasmáticos de Proteínas Totais, Lbumina, Uréia e Creatinina. Dados Apresentados Por Média \pm Epm (N=5-4). Valores De Referência (1) Melo Et Al., 2012- Centro de Bioterismo da Fmusp (2008), Referência (2) Dantas <i>et Al</i> (2006).	49
Tabela 4- Triagem Fitoquímica das Folhas de <i>Kalanchoe Pinnata</i>	53
Tabela 5- Avaliação da Granulometria da Amostra	54
Tabela 6- Determinação de Ph.....	55
Tabela 7- Densidade Aparente de Três Amostras de Cascas Pulverizadas de <i>K. Pinnata</i>	56
Tabela 8- Constituintes Químicos da Fração Hexânica Obtidos das Folhas de <i>K. Pinnata</i> por Cg-Em.....	63

LISTA DE SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila;

CC – Cromatografia em coluna;

Hex – Hexano;

MeOH-1 – Extrato metanólico obtido a partir do processo da Eliminação do endofítico cultivado em arroz;

MeOH-2 – Extrato metanólico obtido por percolação da biomassa retida no arroz após a obtenção do extrato AcOEt-2;

P – Página;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
	2.1 <i>Kalanchoe pinnata</i>.....	18
	2.1.1 Composição química	19
	2.1.2 Flavonoides	21
	2.2 Principais investigações Farmacológicas.....	23
	2.3 Processo Inflamatório e modelos de inflamação.....	27
	2.4 Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos	30
3	OBJETIVOS	31
	3.1 Objetivo geral	31
	3.2 Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS:	32
	4.1. Avaliação de atividade anti-inflamatória em modelo de Bolsa de ar.	32
	4.1.1. Animais	32
	4.1.2 Fármacos	32
	4.1.3. Coleta e Processamento das amostras	32
	4.1.3 Obtensões dos extratos.....	32
	4.1.5. Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória	33
	4.1.6. Modelos da bolsa de ar em ratos	34
	4.1.7. Mensuração do volume do exsudato formado.....	34
	4.1.8 Contagem de células.....	34
	4.1.9. Ensaio de Nitrito.....	35
	4.1.10. Modelo da gaiola metabólica para avaliação da toxicologia.....	35

4.1.11. Métodos para dosagens bioquímicas.....	36
4.2 Caracterização química	37
4.2.1. Equipamentos	37
4.2.2 Solventes	38
4.2.3 Obtenções dos extratos.....	38
4.2.4 Abordagem Fitoquímica.....	39
4.2.5 Análises Físico-Químicas.....	41
4.2.6. Perfil Cromatográfico e Caracterização química	43
4.3. Tratamento Estatístico (pesquisa quantitativa).....	44
5. RESULTADOS E DISCURSÃO	45
5.1. Avaliação de atividade anti-inflamatória do extrato aquoso.....	45
5.1.1. Efeito de <i>Kalanchoe pinnata</i> sobre a migração de células para o exsudato inflamatório	45
5.1.2 Efeito de <i>Kalanchoe pinnata</i> sobre o volume de exsudato inflamatório.	46
5.1.3 Efeito de <i>Kalanchoe pinnata</i> sobre a produção de nitrito no exsudato inflamatório	47
5.1.4 Efeitos de extrato aquoso de <i>Kalanchoe pinnata</i> (Kp) (tabela 3) sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos.	49
5.1.5. Atividade Anti-Inflamatória do extrato metanólico de Kp	50
5.2. Análises Fitoquímicas.....	52
5.2.1. Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários	52
5.2.2. Determinação das características físico-químicas do pó das folhas.....	54
5.2.3. Perfil Cromatográfico e Caracterização Química	57
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (MUTHU *et al.*, 2006). Por volta do terceiro milênio a.C. Hipócrates (cerca de 460-377 a. C), um dos autores da Antiguidade que descreveu produtos naturais medicinais originários de plantas e animais, listou de cerca de 400 diferentes espécies de plantas usadas para fins medicinais. Os produtos naturais faziam parte dos antigos sistemas de medicina tradicional, por exemplo, chinesa, aiurvédica e egípcia (SARKER, 2016).

Ainda hoje, as plantas medicinais são amplamente utilizadas em diversos países, alguns desses conhecidos como industrializados, tais como: Canadá, França, Alemanha e Itália. Estima-se que entre 70% a 90% da população desses países, utiliza as plantas medicinais com o título de “complementar”, “alternativo” ou “não convencional” (ROBINSON & ZANGHE, 2011).

No Brasil não é diferente, nas regiões mais pobres e mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares ou encontradas em quintais de residências. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, os usuários que utilizam este tipo de cultura medicinal despertam o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, ampliando o conhecimento sobre fonte medicinal natural (MACIEL *et al.*, 2002).

Estima-se que aproximadamente 61% das 877 novas entidades químicas de pequenas moléculas introduzidas como fármacos no mundo entre 1981 e 2002 podem ser remontadas a produtos naturais, ou foram desenvolvidas a partir deles. Elas incluem produtos naturais (6%), derivados de produtos naturais (27%), compostos sintéticos com farmacóforos derivados de produtos naturais (5%) e compostos sintéticos planejados com base no conhecimento obtido a partir do produto natural, isto é, imitação de produto natural (23%). Em algumas áreas terapêuticas, a contribuição dos produtos naturais ainda é maior, por exemplo, cerca de 78% dos antibacterianos e 74% dos candidatos a fármacos antineoplásicos malignos são de produtos naturais ou análogos estruturais de produtos naturais.

O uso das plantas medicinais no tratamento de doenças, baseado no conhecimento popular acumulado com o passar do tempo e transmitida de geração para geração, constitui a Medicina Tradicional (MUTHUIRULAPPAN; RAJENDREN, 2013). De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 3,4 bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento usam remédios tradicionais à base de plantas. Isso por volta de 88% da população mundial, que usa principalmente a medicina tradicional na atenção primária à saúde (BRASIL, 2006c; SOUSA *et al.*, 2008). Este ramo do conhecimento deu origem a Fitoterapia que é definida como a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica (FELTROW; AVILA, 2000).

Para iniciar um estudo sobre plantas medicinais, os pesquisadores podem considerar as seguintes abordagens: etnobotânica e/ou quimiosistemática e/ou ao acaso (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Normalmente, a abordagem etnobotânica que visa, principalmente, avaliar e caracterizar os aspectos químicos e farmacológicos das plantas tem sido utilizada para fundamentar os usos tradicionais. Por exemplo, Okwu e Nnamdi (2011), partindo do uso popular de *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) no tratamento de infecções em feridas, isolaram dois flavonoides do extrato etanólico das folhas com atividade antimicrobiana, evidenciando o uso popular da espécie e abrindo perspectivas para obtenção de novos fármacos e medicamentos. Ainda Afzal e colaboradores (2012) isolaram cinco substâncias das folhas de *B. pinnatum*, sendo o derivado esteroidal estigmast-4,20(21),23-trien-3-ona inédito. Essa substância (300 mg/kg) e o extrato aquoso (400 mg/kg) demonstraram atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda de edema de pata induzido por carragenina. A atividade anti-inflamatória de *K. pinnata* pode ser atribuída à presença deste derivado esteroidal e de outros constituintes químicos, como o triterpeno α -amirina e os flavonoides quercetina, canferol, rutina e luteolina (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; OTUKI *et al.*, 2005).

O uso terapêutico de *Kalanchoe pinnata* (Lam). Pers (Crassulaceae) tem sido frequentemente citado em vários estudos etnofarmacológicos tanto no Brasil como em outras partes do mundo (especialmente Índia, África e China) (KAMBOJ; SALUJA, 2009; MAJAZ *et al.*, 2011), além de estar incluída na relação nacional de plantas com interesse ao SUS e dessa forma poderá contribuir com a concretização dessa política no país.

Apesar dos diversos estudos já citados e feitos sobre o potencial farmacológico da *K. pinnata* ainda é possível a seleção e descoberta de novos fármacos com potencial de atividade anti-inflamatório.

Diante disso, esse trabalho demonstra buscar o significativo potencial desta planta em atividades farmacológicas, possibilitando assim a seleção de fármacos/plantas com

potencial atividade anti-inflamatória para o modelo de bolsa ar (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Sendo assim, este estudo visou contribuir para o encontro de uma nova terapêutica mais efetiva e segura para o tratamento de inflamações, através da investigação da espécie vegetal *K. pinnata*. Para isso, foram avaliadas a atividade anti-inflamatórias (modelo de bolsa de ar) bem como a identificação de compostos sugerindo uma possível relação destes com a referida atividade farmacológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Kalanchoe pinnata*

Kalanchoe pinnata pertence à família Crassulaceae. A família é composta pelo gênero *Kalanchoe* que compreende aproximadamente 125 espécies muitas delas nativas da África (COSTA, *et al.*, 2008, EL ABDELLAOUI *et al.*, 2010). Tem como sinônimos os nomes científicos *Sinonimos: Bryophyllum calycinum, B. germinans, B. pinnatum, Cotyledon calycina, C. calyculata, C. pinnata, C. rhizophilla, Crassuvia froripendia, Crassula pinnata, Sedum madagascariense, Vereea pinnata*, é conhecida popularmente na região norte como: coirama, coirama branca, diabinho e em outras regiões do país como: Erva-da-costa, folha-da-costa, folha-da-fortuna, folha-grossa, e orelha-de-monge (MAJAZ *et al.*, 2011). O chá da folha é popularmente utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, diarreia, vômito, picadas de insetos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (ALMEIDA *et al.*, 2000; KAMBOJ;SALUJA, 2009; OKWU; JOSIAH, 2006). É uma planta herbácea, perene, glabra, que pode chegar de 1 a 1,5 metros de altura principalmente na época da floração. Possui folhas opostas, pecioladas, simples, crenadas e muito carnudas (OKWU; NNAMDI, 2011b). Apresenta caule avermelhado com manchas brancas quando jovem e levemente colorido quando mais velho; folhas glabras, verde escuras, carnosas e suculentas, dispostas de forma oposta cruzada, ovaladas ou elípticas, com 8-12 cm de comprimento e 6-8 cm de largura, crenadas ou serradas. Possui inflorescências cimosas púrpuras avermelhadas, com robustos ramos opostos, pedicelos delgados que partem de um mesmo pedúnculo ramificado (BISWAS *et al.*, 2011; MAJAZ *et al.*, 2011; SOUZA; LORENZI, 2005).

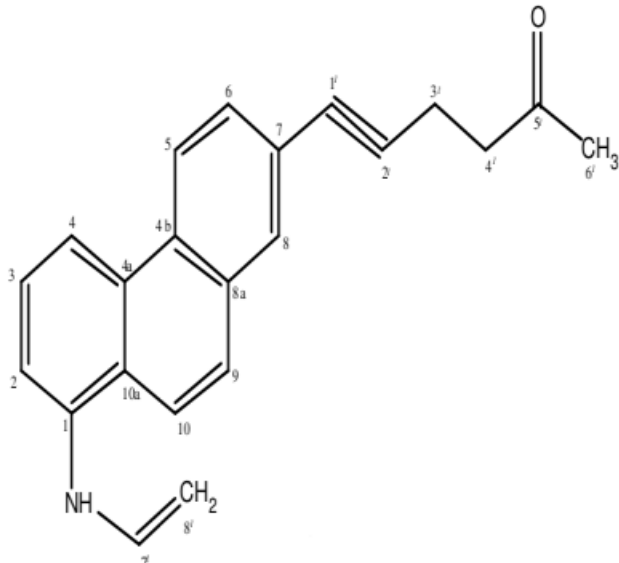
Reproduz-se de forma sexuada por sementes ou vegetativamente através de primórdios celulares dormentes nas bordas do limbo foliar que têm a capacidade de gerar plântulas.

Tem a propriedade de multiplicarem-se pelos ângulos das crenas e nervuras, mesmo se a folha estiver dilacerada, presa a uma parede, a uma árvore, ou ao um sítio qualquer sombreado. As folhas são peitorais, emolientes e refrescantes topicamente (BRAGA, 1951). A *Kalanchoe pinnata* apresenta propagação vegetativa (pelas folhas), sendo também de fácil propagação em qualquer solo (SOARES *et al.*, 2009).

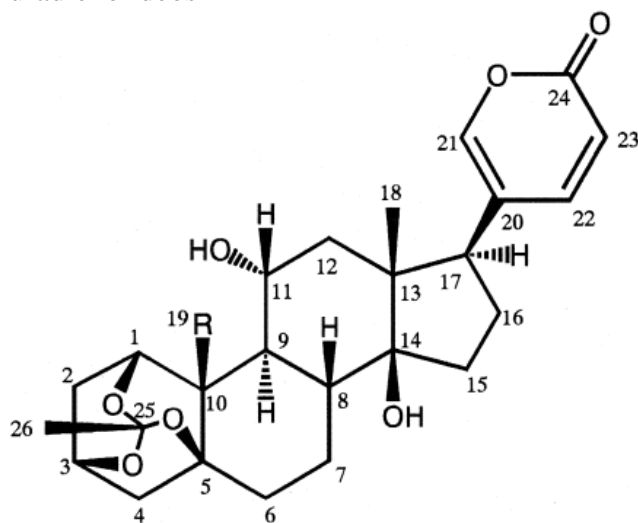
2.1.1 Composição química

Nas análises fitoquímicas realizadas foram identificadas diversas classes e substâncias os quais já foram isoladas em diferentes extratos e frações que apresentaram potenciais farmacológicos (AFZAL *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2012; HAM *et al.*, 2012 MEDEIROS *et al.*, 2007; TATSIMO *et al.*, 2012; OKWU; NNAMDI, 2009, 2011; OTUKI *et al.*, 2005). Algumas estão listadas na tabela 1. Com relação às folhas de *K. pinnata* já foi relatada a presença majoritária de flavonoides (livres e glicosilados), saponinas e alcaloides, sendo os flavonoides a principal classe química do gênero *Bryophyllum* (CRUZ *et al.*, 2011; OKWU; JOSIAH, 2006). Muzitano e colaboradores (2011) avaliaram a influência das condições de cultivo, estação do ano e método de extração sobre a concentração de flavonoides encontrada em extratos aquosos de *K. pinnata* e demonstraram que o conteúdo flavonoídico é potencializado quando a planta é mantida sobre maior exposição à luz solar e coletada nos períodos do ano em que há maior incidência de radiação solar (verão e primavera).

Tabela 1-Diversas classes e substâncias os quais já foram isoladas.

Classe Química/ Estrutura	Autores
Ácidos Orgânicos	PURCHER, 1942; MARRIAGE; WILSON, 1971
 <p>Alcaloides (1 - Etenoamina 7 – hex – 1 – ino – 5 - ona fenantreno)</p>	OKWU; JOSIAH, 2006; BISWAS <i>et al.</i> , 2011
Ácidos graxos	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2000

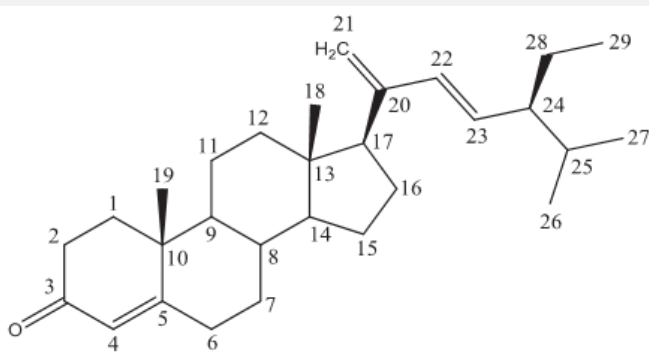
Bufadienolídeos



(Bufadienolídeo-1, 3, 5-ortoacetato)

KAMBOJ; SALUJA, 2009; SUPRATMAN et al., 2001; YAMAGISHI et al., 1989

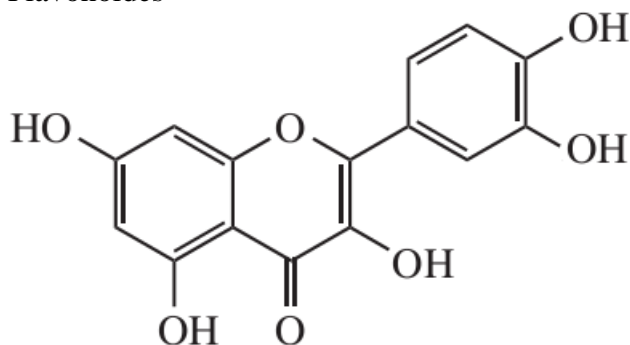
Esteróides



(Stigmast-4, 20 (21), 23-trieno-3-ona)

KAMBOJ; SALUJA, 2010; BISWAS et al., 2011; AFZAL et al., 2012

Flavonoides



(QUERCETINA)

GAIND; GUPTA, 1971; MUZITANO et al., 2006a;b;c

Gomas, Carboidratos e Mucilagens

BISWAS et al., 2011; KAMBOJ; SALUJA, 2010; MORTON, 1990

Saponinas

OKWU; JOSIAH, 2006; BISWAS et al., 2011

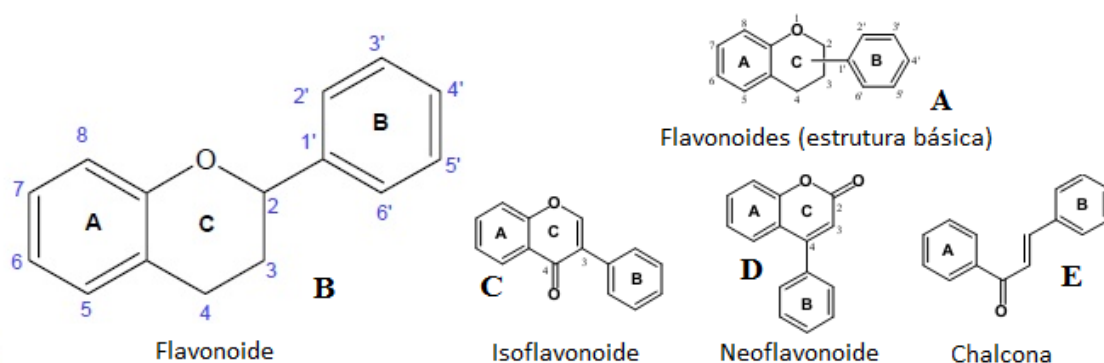
Taninos	CHATURVEDI; JOSHI; DUBEY, 2012; OKWU; JOSIAH, 2006;
Terpenos	SIDDIQUI <i>et al.</i> , 1989; KAMBOJ; SALUJA, 2010

Fonte: Autor (2017)

2.1.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior, mais diversificado e importante grupo de polifenóis, com mais de 5.000 substâncias identificadas. Na natureza, essas substâncias são geralmente encontradas na forma de heterosídeos ligadas a moléculas de açúcar ou, menos frequente, na forma livre ou aglicona (IBRAHIM, 2001b; SOTO-VACA *et al.*, 2012; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007). Possuem estrutura molecular básica de 15 carbonos (C15), representada na Figura 4A e B, do tipo fenilbenzopirano (C6-C3-C6), que consiste em dois anéis aromáticos A e B (C6), ambos de natureza fenólica, e um anel heterocíclico C (C3) contendo um oxigênio como heteroátomo (IBRAHIM, 2001b; TSAO, 2010).

Figura 1- Estruturas básicas dos flavonoides e suas subclasses.

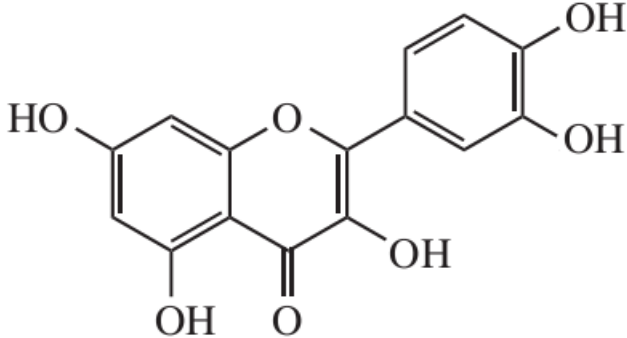
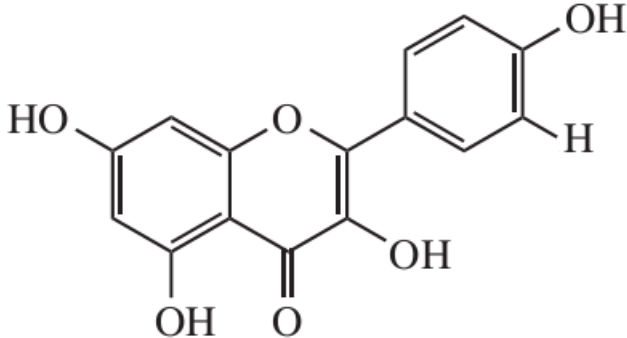
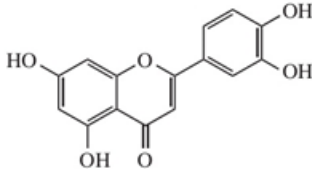


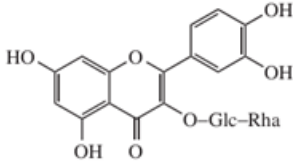
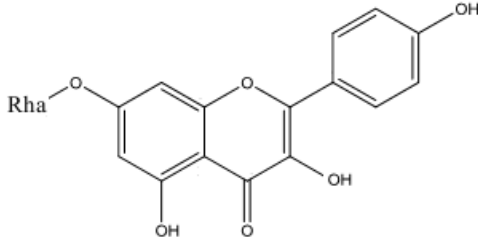
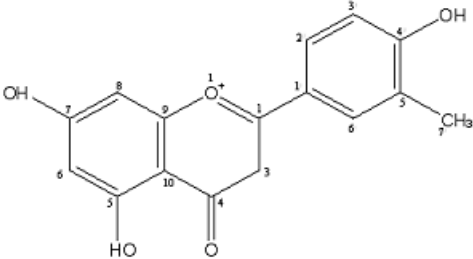
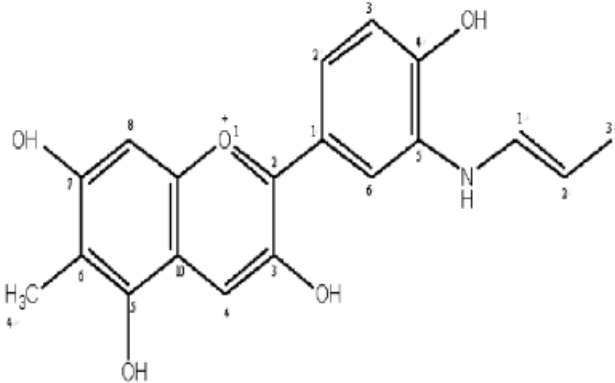
Fonte: (Dornas *et al.*, 2007)

Os flavonoides representam uma classe de substâncias relevante para o gênero *Kalanchoe*, assim como para a espécie *K. pinnata*, já que vários compostos flavonoídicos foram isolados (COSTA *et al.* 2008; MUZITANO *et al.*, 2006a). Os flavonoides isolados e identificados para a espécie *K. pinnata* estão descritos na Tabela 2.

Estes metabólitos secundários estão distribuídos no reino vegetal. São largamente consumidos pelos humanos em sua dieta (GONZÁLEZ *et al.*, 2011;MOTA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2007; PROENÇA DA CUNHA, 2005). São caracterizados por possuírem a estrutura 2-fenil-benzopirona (BENAVENTEGARCÍA *et al.*, 1997). Estão presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos. Possuem atividade antioxidante (BENAVENTEGARCÍA *et al.*, 1997; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), atividade leishmanicida (MUZITANO *et al.*, 2006b;c; 2008), atividade anti-inflamatória (GONZÁLEZ *et al.*, 2011), atividade antiúlcera (KWAK *et al.*, 2012), atuam na prevenção de doenças cardiovasculares (VAN DAM; NAIDOO; LANDBERG, 2013) entre outras.

Tabela 2- Flavonoides isolados e identificados para a espécie *K. pinnata*.

Flavonoides isolados	Referências
<p>Quercetina</p> 	<p>GOKBULUT <i>et al.</i>, 2013 GARCÍA-MEDIAVILLA <i>et al.</i>, 2007 MUZITANO <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>Canferol</p> 	<p>GARCÍA-MEDIAVILLA <i>et al.</i>, 2007 GOKBULUT <i>et al.</i>, 2013 MUZITANO <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>Luteolina</p> 	<p>MAJAZ <i>et al.</i>, 2011 GOKBULUT <i>et al.</i>, 2013 BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012</p>
<p>Rutina</p>	<p>MAJAZ <i>et al.</i>, 2011</p>

	<p>GOKBULUT <i>et al.</i>, 2013 LEE <i>et al.</i>, 2013</p>
<p>α-Rhamnoisorobina</p> 	<p>TATSIMO <i>et al.</i>, 2012</p>
<p>5'-Metil 4',5,7-trihidroxi flavona</p> 	<p>OKWU; NNAMDI, 2011b</p>
<p>4', 3, 5, 7-tetrahidroxi 5-metil 5'-propenamina antocianidina</p> 	<p>OKWU; NNAMDI, 2011b</p>

Fonte: Autor (2017)

2.2 Principais investigações Farmacológicas.

Nesta seção serão reportadas as principais atividades farmacológicas e *in vitro* encontradas na literatura.

Estudos farmacológicos relacionados à *K. pinnata* têm confirmado as atividades anti-inflamatória (AFZAL *et al.*, 2012; GUPTA; LOHANI; ARORA, 2010; OJEWOLE, 2005); antioxidante (BISWAS *et al.*, 2011); antimicrobiana (AKINPELU *et al.*, 2000; AKINSULIRE *et al.*, 2007; OKWU; NNAMDI, 2011); cicatrizante (NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010); antinociceptiva (IGWE; AKUNYILI, 2005; NGUELEFACK *et al.*, 2006; OJEWOLE, 2005); antidiabética (OJEWOLE, 2005); imunossupressora e antialérgica (CRUZ *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2012) e atividade leishmanicida (MUZITANO *et al.*, 2006, 2011). Além disso, atividades anticancerígena, neurológica (sedativa e relaxante muscular), hipoglicemiante e hipolipidêmica têm sido citadas na literatura (MAHATTA *et al.*, 2012; OGBONNIA; ODIMEGWU; ENWURU, 2008; SALAHDEEN; YEMIATAN, 2006; YEMIATAN; SALAHDEEN, 2005).

Atividade Antiúlcera: Poucos e incompletos estudos utilizando *Kalanchoe sp* e *K. pinnata* foram realizados para a verificação da atividade antiúlcera. A administração do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe ssp* resultou em uma redução nas lesões gástricas induzidas por indometacina (PEREZ; CORREA; BORGES, 1999). Adesanwo *et al.* (2007) também verificaram que o extrato metanólico de *K. pinnata* exerceu uma ação gastroprotetora, quando a mucosa gástrica foi exposta ao mesmo agente lesivo, citado acima. Em outro estudo, a administração da fração metanólica, por via intraperitoneal, das folhas de *K. pinnata* inibiu o desenvolvimento de úlcera gástrica aguda em ratos induzida por diversos modelos experimentais, tais como: ácido acetilsalicílico, indometacina, serotonina, reserpina, estresse, etanol 50%. No referido trabalho também foi observada significativa redução das lesões gástricas ocasionadas por aspirina na ligadura do piloro em ratos, redução de úlceras duodenais induzidas por histamina em cobaias e uma significativa cicatrização em lesões gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos (PAL; CHAUDHURI, 1991).

Atividade Antioxidante: *K. pinnata* tem sido alvo de estudo da atividade antioxidante *in vitro* (GUPTA; BANERJEE, 2011; HARLALKA; PATIL; PATIL, 2007; JAIN *et al.*, 2010). Gupta e Banerjee (2011) aperfeiçoaram o processo de extração de substâncias fenólicas e avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) e ABTS (2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato), demonstrando uma significativa correlação com os teores de fenóis totais. Em outro estudo, Tatsimo *et al.* (2012) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico, fração acetato de etila e fração hexânica da planta inteira *K. pinnata*. Esta atividade também foi verificada em 6 compostos isolados da fração acetato de etila. Ácido ascórbico foi utilizado como substância referência. De acordo com o estudo o extrato metanólico apresentou melhor atividade em comparação com fração acetato de etila, os autores

sugerem que são os flavonoides responsáveis pela atividade antioxidante do extrato metanólico e que o fracionamento deste não aumentou tal atividade nas frações.

Atividade Antimicrobiana e Citotóxica: Quanto a atividade anti-microbiana Akinsulire e outros (2007) investigaram as folhas de *K. pinnata*, utilizando como solvente água, metanol e bebidas alcoólicas e o sumo das folhas foi obtido por processo mecânico. Os extratos foram ativos contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi* e *Citrobacter spp*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*). Akinpelu (2000) comprovou a atividade antimicrobiana utilizando o extrato metanólico 60% das folhas que inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 25mg/mL.

Okwu e Nnamdi (2011) isolaram e identificaram um alcalóide fenantrênico (etanamino-7-Hex-1-in-5-ona fenantreno) do extrato etanólico das folhas de *K.pinnata*. Este composto bioativo promoveu a inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os autores concluíram que este composto possui atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas bem como ação contra fungos.

Quanto à citotoxicidade, foram realizados alguns estudos (BISWAS *et al.*, 2011; El ABDELLAOUI *et al.*, 2010; GREER *et al.*, 2010). El Abdellaoui *et al.* (2010) verificaram que uma das frações do extrato metanólico, além de ser eficaz contra os micro-organismos também apresentou baixa atividade citotóxica. Greer *et al.* (2010) observaram que o extrato acetônico de raízes de *K. pinnata* apresentou citotoxicidade pouco expressiva em células Vero C1008, além de também apresentar atividade antiviral, contra o vírus da herpes HSV1 e HSV2.

Atividade Cicatrizante: A atividade cicatrizante do extrato etanólico de folhas de *K. pinnata* foi avaliada em modelo animal através de incisão no dorso. Animais tratados durante 11 dias com o extrato, na dose de 100 mg/kg via tópica, apresentaram inibição da lesão em 86.33%, comparando ao grupo controle negativo, óleo de petróleo (69.36%) e com o grupo tratado com a substância-padrão, muciprocina (85.49%). Análises histológicas exibiram uma significativa cicatrização. Os autores ressaltam também que mais investigações devem ser realizadas em relação aos bufadienolídeos, uma classe de metabólitos encontrada em espécie de *K. pinnata*, para a verificação de uma possível relação com a atividade biológica observada (NAYAK; MARSALL; ISITOR, 2010).

Outras Atividades: Vários trabalhos foram realizados para a demonstração de atividade leishmanicida (Da Silva *et al.*, 1995, Muzitano *et al.*, 2006b; c; 2008). Da Silva *et al.*

(1995) avaliaram o efeito do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*. No tratamento por via oral com o extrato, houve a diminuição do crescimento das lesões acompanhada pela diminuição dos números de parasitas viáveis.

Também foi relatada a atividade antitumoral de *K. pinnata*. Supratman *et al.* (2000) isolaram três compostos da classe dos bufadienolídeos de folhas frescas de *K. pinnata* e foram identificados como briofilina A, briofilina C e bersaldegenina-3-acetato. Em estudo posterior, os compostos ensaiados apresentaram atividade inibitória. Os autores sugerem que estes bufadienolídeos possuem um alto potencial para a quimioprevenção contra o câncer (SUPRATMAN *et al.*, 2001).

Atividade Anti-inflamatória: Vários trabalhos confirmaram o potencial anti-inflamatório de *Kalanchoe pinnata*, foi descrito por Gupta; Lohandi; Arora (2010) que avaliaram diferentes extratos (aquoso, em éter de petróleo, clorofórmico, em acetona e metanólico) das folhas e frações enriquecidas de alcaloides e flavonoides, através do modelo de inflamação por edema de pata induzido por formaldeído, e demonstraram um significativo efeito do extrato metanólico. Ojewole em 2005 testou o extrato aquoso e o mesmo também reduziu significativamente o edema de pata induzido por albumina com efeito dependente da dose e do tempo.

Em um trabalho Afzal *et al.* (2012) verificaram que o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*, na dose de 400 mg/kg, via oral, e o composto estigmast-4,20 (21), 23-trien-3-ona, isolado do extrato aquoso, na dose de 300 mg/kg, reduziram inflamação induzida por carragenina em ratos Wistar. Além do mais, foi observado que este composto esteroideal, na dose de 300 mg/kg administrado por via intraperitoneal, possui significativa atividade analgésica quando comparado com a fármaco padrão (diclofenaco) e o extrato aquoso. Dessa maneira, os autores sugerem que ambas as atividades verificadas para o extrato aquoso estão relacionadas principalmente com a presença deste composto esteroideal.

Em outro estudo, a administração da fração metanólica, por via intraperitoneal, das folhas de *K. pinnata* inibiu o desenvolvimento de úlcera gástrica aguda em ratos induzida por diversos modelos experimentais, tais como: ácido acetilsalicílico, indometacina, serotonina, reserpina, estresse, etanol 50%. crônicas (PAL; CHAUDHURI,1991).

2.3 Processo Inflamatório e modelos de inflamação.

O processo inflamatório é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (NATHAN, 2002). O reconhecimento desencadeia a ativação e à amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. Neste sentido, a inflamação é um termo usado para descrever uma série de respostas de tecidos vascularizados, que podemos definir como um conjunto de manifestações hemodinâmicas, interações celulares e atividade de fatores solúveis, que constituem uma resposta protetora imediata do sistema imune a algum tipo de agressão ao organismo (trauma mecânico, radiação, calor, frio), químicos (substâncias irritantes, álcalis e outros) ou biológicos, provocada por microorganismos tais como fungos, bactérias, vírus ou protozoários. (LARSEN; HENSON, 1983). Cada tipo de estímulo ativa um padrão característico de resposta por parte do sistema imune, dependendo dos componentes de reconhecimento e mediadores produzindo células imunologicamente competentes que são acionadas e agem no sentido de inativar ou destruir microorganismos invasores, remover substâncias irritantes e proteínas antigênicas, além de iniciar a reparação tecidual (ALI *et al.*, 1997; SILVA; CARVALHO, 2004).

O processo inflamatório como um todo, passa por três fases distintas: Fase transitória aguda (vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular): é a de curta duração, ocorrendo nas primeiras horas ou dias e caracteriza-se pela não especificidade e grande quantidade de exsudação do fluido e de proteínas do plasma para o interstício com o objetivo de eliminar os tecidos mortos, proteger contra infecção local e permitir o acesso do sistema imune à área danificada. (MAJNO, 1961; BUTCHIER, 1991; STEVENS & LOWE, 1998); Fase subaguda ocorre infiltração dos leucócitos e células fagocitárias este evento celular é denominado de quimiotaxia. Os fatores quimiotáticos são gerados tanto na corrente sanguínea quanto no sítio da lesão. Assim, o sistema complemento e as cininas são considerados importantes fatores quimiotáticos de origem plasmática (FRANGOGIANNIS *et al.*, 2002). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo; Fase proliferativa crônica (degeneração tecidual e fibrose): persistindo o agente lesivo, inicia-se a fase crônica, que é de longa duração e esta, na maioria das vezes, associada com a presença de células (linfócitos, macrófagos, dentre outras), angiogênese, fibrose e necrose de tecidos (DRAY, 1995, SILVA; CARVALHO, 2004). Os sinais cardinais da inflamação – calor, rubor, dor e edema – são

consequência dos efeitos mediados sobre a circulação sanguínea no local, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e liberação de agentes indutores de dor. A perda de função do tecido vascularizado afetado pela inflamação também é considerada um sinal cardinal adicional, porém como isso irá ocorrer depende muito do tipo de tecido em questão e do processo inflamatório em si (ALI *et al.*, 1997; LARSEN; HENSON, 1983).

A resposta edematogênica ocorre principalmente devido à liberação inicial de substâncias como a histamina, a serotonina e a bradicinina que terão como ação principal a indução de aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas proteicas do plasma para o interstício, embora também possam causar dilatação arteriolar. Este extravasamento plasmático se faz acompanhar, oncoticamente, pela saída de água. A atividade edematogênica destes mediadores pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras, como PGE2 e a PGI2 (WILLIAMS; KUPPER, 1996). Desta forma, os DAINES, que diminuem a produção de prostaglandinas através da inibição enzimática das ciclooxigenases (COX's), retiram a potenciação exercida pelo efeito vasodilatador destes mediadores lipídicos e reduzem o edema inflamatório (SMITH *et al.*, 2000; MORRIS, 2004)

O óxido nítrico (NO) é formado a partir do oxigênio molecular e da L-arginina através de uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADA *et al.*, 1991). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO, entre os quais as células endoteliais (WRIGT *et al.*, 1989), macrófagos (DI ROSA *et al.*, 1990), sinoviócitos (MCLNNES *et al.*, 1996) e condrócitos (STADLER *et al.*, 1992). O óxido nítrico é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade. Assim, o alto nível de óxido nítrico produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (FLORA *et al.*, 2000). Esta pequena molécula tem efeitos fascinantes desde a manutenção inicial da vida, através do controle da circulação placentária, como também efeitos letais consideráveis, por exemplo, no choque séptico. Além disso, sua atividade na imunoregulação está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). O papel do óxido nítrico na inflamação é um dos aspectos mais estudados na fisiologia nos últimos anos. Alguns estudos mostram um importante papel no NO como agente anti-inflamatório, entretanto muitos outros demonstram a participação

dessa molécula como indutora de disfunções teciduais e da ativação de células inflamatórias. Esse aparente paradoxo pode ser entendido estudando-se a química fisiológica do NO e seu metabolismo, determinando assim, uma distinção entre os efeitos deletérios e benéficos desse composto (GRISHAM *et al.*, 1999).

A interação direta do NO com proteínas metálicas ou com radicais orgânicos livres representam as duas principais formas de efeitos biológicos deste composto nos sistemas biológicos (WINK *et al.*, 1997; PADMAJA & HUIE, 1993). Em constante, os efeitos indiretos são mediados por espécies oxidas de nitrogênio altamente reativas, formadas pela reação do NO com O₂ e O²⁻. Essas espécies estão associadas com a fisiopatologia de diversos modelos de inflamação (GRISHAM *et al.*, 1998; NATHAN, 1997; WINK & MITCHELL, 1998) e as mais significantes são trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) e anión nitrato (ONOO⁻), que induzem dois tipos de estresse químico: oxidação e nitrosação (WINK & MITCHELL, 1998).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios promoveu o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias e diversos agentes terapêuticos estão disponíveis para o tratamento (SKINNER, 2005). Os fármacos anti-inflamatórios estão entre os mais utilizados pela medicina moderna e alguns tiveram origem de produtos naturais ou (semi) sintéticos, como o ácido acetilsalicílico (A.A.S.), um AINE, proveniente do ácido salicílico obtido de *Salix spp* (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de pata, de orelha, bolsa de ar, induzido por agentes flogísticos e pleurisia têm sido utilizados frequentemente nos estudos de atividade anti-inflamatória com produtos naturais e sintéticos (WILLOUGHBY, 2003). No entanto, algumas técnicas apresentam limitações: dificuldades de manipulação durante a indução da inflamação e de quantificação dos parâmetros inflamatórios (edema, número e tipo de células envolvidas, extravasamento de proteínas, mediadores envolvidos). Dentre os agentes flogísticos que podem ser utilizados destaca-se a carragenina, obtido de algas marinhas. Este agente produz uma resposta inflamatória aguda no modelo da pleurisia em camundongos. Quatro horas após a administração da carragenina ocorre aumento da exsudação bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Já o modelo da bolsa de ar tem seus primeiros relatos em ratos na década de 60 (OKUDAIRA e SCHUWARZ, 1962) e em camundongos nos anos 70 (CLARK, 1975). Neste modelo, a partir do lavado da bolsa de ar, é viável a avaliação do extravasamento de líquido, a migração de células bem como a mensuração de enzimas como a ciclooxigenase e outros mediadores como óxido nítrico, prostaglandinas e leucotrienos, induzidos por diversos agentes flogísticos (DAWSON *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1994; POSADAS *et al.*, 2000).

As técnicas da pleurisia e do modelo da bolsa de ar possuem vantagens em relação à outras técnicas já citadas anteriormente, pois a partir da coleta dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar é possível analisar e quantificar diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico, entre outros), além da participação de enzimas como mieloperoxidase e adenosina-deaminase, sem a necessidade de recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem dos modelos citados é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos podem ser estudados.

2.4 Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos

No Brasil, a partir de 1980, foram criados diversos instrumentos normativos como resoluções e portarias, que tratam a respeito da fitoterapia como interesse popular e institucional. Em 2006 foram lançadas duas políticas nacionais, Política Nacional de Plantas Mediciniais e Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, que vêm fortalecendo a geração de conhecimento acerca dos fitoterápicos.

O Ministério da Saúde, no cumprimento de suas atribuições de coordenação do Sistema Único de Saúde (SUS) e de estabelecimento de políticas para garantir a integralidade na atenção à saúde, lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS que busca atender à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, entre as quais destaca-se a Fitoterapia. Dentre as diretrizes do PNPIC para o segmento de “Plantas Mediciniais e Fitoterápicos” está a Diretriz PMF1 - Elaboração da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e da Relação Nacional de Fitoterápicos (RENISUS). Essa relação de plantas medicinais foi elaborada e consta de 71 espécies com as quais o SUS tem focado seu atendimento e as diretrizes do PNPIC (BRASIL, 2006b).

A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos tem por objetivo geral- “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos”, além de “promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”, as Ciências Farmacêuticas (CF) podem contribuir fortemente para esse objetivo geral atendendo ao primeiro objetivo específico do mesmo documento: “ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos em serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Relacionar os efeitos anti-inflamatórios, em modelo de bolsa de ar, da *Kalanchoe pinnata* com substâncias identificadas em extrato metanólico, bem como a ocorrência de alguma propriedade toxêmica.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a inibição do óxido nítrico como mecanismos associado ao extrato aquoso de *Kalanchoe pinnata*;
- *Estudar* efeitos anti-inflamatórios da *Kalanchoe pinnata* identificadas em extrato metanólico em modelo de bolsa de ar (v.o e i.p);
- Relacionar os efeitos anti-inflamatórios da *Kalanchoe pinnata* com substâncias identificadas em frações de extrato metanólico;
- Verificar possível propriedade toxêmica do extrato de *Kalanchoe pinnata* por testes bioquímicos de função renal ou hepática do extrato aquoso.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Avaliação de atividade anti-inflamatória em modelo de Bolsa de ar.

4.1.1. Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar (180-200 g), machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério UFOPA- campus Oriximiná. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* a temperatura ambiente (22-25 °C). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEUA) desta instituição (protocolo nº 105/2012).

4.1.2 Fármacos

- Dexametasona - um glicocorticoide com ação anti-inflamatória;
- Carragenina (agente flogístico que induziu a inflamação) um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondros crispus*;
- Cetamina;
- Xilazina.

4.1.3. Coleta e Processamento das amostras

A *Kalanchoe pinnata* foi coletada na Universidade Federal do Oeste do Pará, campus de Oriximiná - Pará, no período de setembro a outubro em que há maior incidência de radiação solar, devido ao verão amazônico, o que pode potencializar o teor de substâncias presentes na planta (MUZITANO *et al.*, 2011). Para preparo do extrato, coletou-se folhas de *K. pinnata* que foram submetidas à secagem em estufa com ventilação, a uma temperatura de 40°C até completa secagem. Após secagem, o material foi rasurado para realização posterior de extração dos constituintes.

4.1.3 Obtenções dos extratos.

Os extratos aquosos foram preparados de acordo com a metodologia de Decocção. O extrato bruto por decocção foi elaborado utilizando dois frascos ambarados vidro de capacidade

para 1000 ml em banho-maria a 90°C por um período de 15 minutos foi adicionado a *Kalanchoe pinnata*. Esta temperatura garantiu a ebulição do solvente utilizado, dando origem às diferentes diluições. Esta mistura foi mantida em repouso durante o resfriamento ao abrigo da luz. Após isso, procedeu-se a filtração dos extratos e foram utilizados logo em seguida em testes anti-inflamatórios.

Para a obtenção dos extratos foram utilizados 3,05 kg do material vegetal seco distribuídos uniformemente em 8 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL (375 g de material a cada frasco). Em seguida, adicionou-se 500 ml de metanol e o material vegetal foi incubado em modo estático sem presença de luz por 2 dias. Posteriormente, a amostra foi submetida à filtração simples, e após isso o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo para a obtenção do extrato MeOH-1 (15,4 g).

4.1.5. Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato metanólico e extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* foi avaliada pelo modelo inflamatório de bolsa de ar em ratos. Os fármacos utilizados foram: Dexametasona - um glicocorticoide com ação anti-inflamatória, a Carragenina (agente flogístico que induziu a inflamação) um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondros crispus* (Sigma-Aldrich®), e o extrato. Cada ensaio foi constituído por três grupos, todos com cinco indivíduos (n = 5): Primeiro grupo (controle negativo): onde os animais receberam veículo solução salina 0,9% e aplicados na parte intraescapular de cada animal + carragenina 1%; Segundo grupo (controle positivo): onde os animais receberam dexametasona 600 µg/Kg – i.p. + carragenina 1% na bolsa de ar; Terceiro grupo (grupo tratado): animais que receberam o extrato metanólico nas diferentes concentrações de 200 mg/kg e 400 mg/kg e extrato aquoso nas diferentes diluições (Kp 0,1, 1 ou 10 %) i.p.

Após indução do processo inflamatório e tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Antes da indução do processo inflamatório, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg).

4.1.6. Modelos da bolsa de ar em ratos

O experimento da bolsa foi realizado em um período de 10 dias. No primeiro dia foi feita a tricotomia e a “confecção” da bolsa de ar. A bolsa de ar foi feita, a partir da injeção subcutânea de 20 ml de ar estéril na região intraescapular dos ratos (Edward *et al.*, 1981; Tao *et al.*, 1999). No terceiro e no sexto dia após o início do experimento, as bolsas foram reinfladas com 10 ml de ar também estéril. No nono dia do experimento, foi injetado dentro da bolsa de ar 2 ml de carragenina 1% a qual corresponde o agente flogístico (induz inflamação), neste mesmo dia, uma hora antes da injeção da carragenina, é administrado por via intraperitoneal veículo (NaCl 0,9%), dexametasona, e *Kalanchoe pinnata* nas diferentes diluições, nos respectivos grupos. No décimo dia, dezesseis horas depois da administração de carragenina na bolsa de ar, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e então foi feita uma fissura na região anterior da bolsa para a retirada do exsudato, antes da retirada do exsudato, é injetado dentro da bolsa de ar 1 ml de solução salina com EDTA 0,1%. O exsudato celular foi separado por centrifugação e armazenado em refrigeração de -80° C para posterior dosagens de nitrito. A avaliação da efetividade da técnica é determinada pelo volume de exsudato formado e pelo número de células recrutadas. Logo após a abertura das bolsas, foi realizado a contagem total de leucócitos segundo Ribeiro *et al.*, 2000.

4.1.7. Mensuração do volume do exsudato formado

O exsudato formado foi coletado da bolsa ar com uma pipeta Pasteur esterilizada, imediatamente após abertura da bolsa. O volume final foi mensurado pela diferença do volume total coletado menos 1 ml de solução salina com EDTA 0,1% adicionado na bolsa.

4.1.8 Contagem de células

Após a coleta de exsudato uma alíquota de 20 µl foi retirada e adicionada a 180 µl de solução salina com EDTA 0,1%, posteriormente foi retirado desta mistura 20 µl e adicionado a 180 µl do corante de Turk, a partir de então foi retirado uma alíquota da solução resultante para submissão a contagem do número total de células em câmara de Neubauer imediatamente após abertura das bolsas de ar.

4.1.9. Ensaio de Nitrito

O ensaio do nitrito será realizado pela adição de reagente de Griess no material a ser analisado. Este reagente é preparado pela mistura de volume de solução de naftil-etileno a 0,1% com a solução de sulfanilamida a 1 % em ácido fosfórico a 5%. Um volume de 500 µL de amostra é misturada com o mesmo volume de reagente de Griess. O resultado da reação é a coloração rosa púrpura do meio. Este será posteriormente medido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito serão determinadas pela comparação com os resultados obtidos pela curva padrão de diluições seriadas de nitrito de sódio.

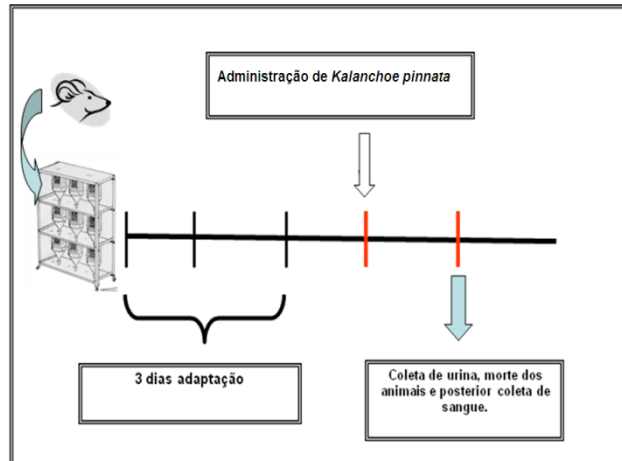
4.1.10. Modelo da gaiola metabólica para avaliação da toxicologia

Para avaliar as possíveis ações tóxicas de *Kalanchoe pinnata* testadas na administração i.p. em diferentes diluições nos animais, utiliza-se uma metodologia onde as substâncias-testes, em suas concentrações testadas são administradas via intraperitoneal a fim de avaliar a atividade hepática e renal dos animais.

Para isso, os animais passaram por um período de adaptação de 3 dias nas gaiolas metabólicas, e ocorreu a administração das diluições de *Kalanchoe pinnata*, os animais foram colocados novamente nas gaiolas, para a coleta de urina acumulada de 24 horas. Após este período, os animais foram decapitados em guilhotina. O sangue coletado foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min.

O plasma e a urina foram armazenados a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a dosagens bioquímicas, a partir da utilização de kits de ensaio bioquímico específicos, e analisados por espectrofotometria utilizando espectrofotômetro, aparelho que mede a quantidade de luz obtida, a partir das colorações das reações, em filtro de comprimento de onda específico para cada substância dosada, sendo a cor formada na reação, diretamente proporcional a atividade enzimática da substância analisada. O material foi utilizado para dosagem dos seguintes parâmetros bioquímicos: proteínas totais e albumina, uréia e creatinina urinária e plasmática. Os animais foram divididos em grupos controle, onde receberam solução salina 0,9% e experimentais onde foi administrado *Kalanchoe pinnata* nas diferentes diluições testadas.

Figura 2- Desenho esquemático do protocolo da gaiola metabólica.



Fonte: Leonia Oliveira (2015).

Figura 3-. Gaiola metabólica



Fonte: Leonia Oliveira (2015)

i. Métodos para dosagens bioquímicas

4.1.12 Dosagem de proteínas Totais e Albumina

A dosagem de proteínas totais do soro ou plasma e a fração de albumina foram avaliadas seguindo o princípio no qual a albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes (Lima, 1993; Motta, 1999). O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvibilidade máxima de um corante complexo (verde de bromo cresol) quando se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na

amostra até a concentração até 6,0 g/dl (Lima, 1993; Motta, 1999). O kit Utilizado para esta dosagem foi produzido pelo laboratório LABTEST Diagnóstica, catálogo 19.

4.1.13 Dosagem de ureia

Para dosagem de uréia, o método utilizado baseia-se no princípio onde a uréia é hidrolisada pela uréase a íons amônio e CO₂. Os íons reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra (Lima, 1993; Motta 1999). Foi utilizado o kit fabricado pelo laboratório LABTEST Diagnóstica, catálogo 27.

4.1.14 Dosagem de creatinina

O princípio para dosagem de creatinina tanto plasmática quanto urinária foi executado seguindo o princípio no qual a creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidulante abaixa o pH para 5.0, promovendo a composição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira (Lima, 1993; Motta, 1999). O kit utilizado para esta dosagem foi produzido pela LABTEST Diagnóstica, catálogo 44.

Essas análises dos níveis plasmáticos dos indicadores bioquímicos do metabolismo dos principais órgãos depuradores do sangue (fígado e rins) foram realizadas através de kits ELISA comerciais. E seguirão protocolos segundo Lima (1993) e Motta (1999).

4.2 Caracterização química

4.2.1. Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC);
- Evaporador rotativo – Modelo Quimis;
- Capela de fluxo laminar- Modelo PA 320 PACHANE;

- Balança analítica Sartorius;
- Estufa – Modelo QUIMIS.
- Cromatógrafo com Fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

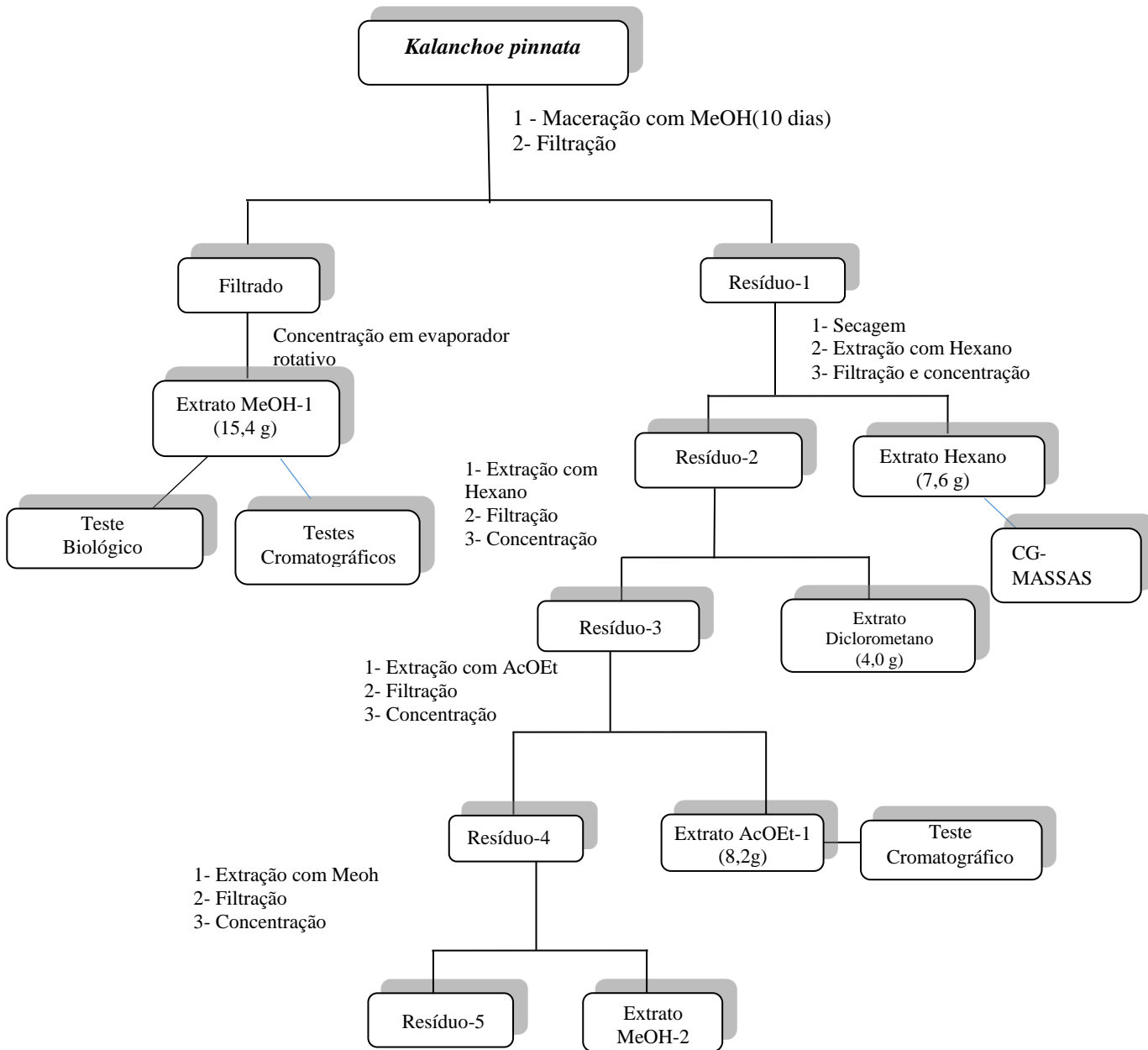
4.2.2 Solventes

- Utilizados no isolamento e purificação de amostras: metanol, hexano, dicloro metano (SYNTH e QUIMEX);
- Utilizados na obtenção dos espectros de RMN 1H e 13C: CDCl₃, CD₃OD e DMSO-d₆, (SYNTH e QUIMEX).

4.2.3 Obtenções dos extratos.

Para a obtenção dos extratos foram utilizados 3,05 kg do material vegetal seco distribuídos uniformemente em 8 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL (375 g de material a cada frasco). Em seguida, adicionou-se 500 ml de metanol e o material vegetal foi incubado em modo estático sem presença de luz por 10 dias. Posteriormente, a amostra foi submetida à filtração simples, utilizando gaze como filtros, e após isso o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo para a obtenção do extrato MeOH-1 (15,4 g). Ao resíduo resultante da filtração foram adicionados para processo de extração os solventes hexano (1x), acetato de etila (1x) e metanol (2x), os quais após eliminação do solvente em evaporador rotativo originaram respectivamente os extratos denominados Hex (7,6 g), Diclorometano (4,0 g), AcOEt-1 (8,2 g), e MeOH-2 (3,0 g), representados no fluxograma da figura abaixo.

Figura 4- Fluxograma da obtenção dos extratos do material vegetal da planta *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: Autor (2017)

4.2.4 Abordagem Fitoquímica

O extrato foi submetido a uma investigação dos constituintes químicos por classe metabólica, ou seja, triagem fitoquímica preliminar no qual é utilizada para se determinar quais metabólitos secundários estão presentes na droga vegetal. É bastante importante quando não se conhece o metabólito ativo da espécie em estudo.

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

4.2.4.1 Saponinas

Uma solução mãe foi preparada com 420 mg de cada extrato seco e 84 mL de água destilada separadamente. A solubilização do extrato ao solvente foi realizada em ultrassom. Após este procedimento, foi realizada uma filtração simples. A 2,00g da droga vegetal, adicionou-se 10,00mL de água deionizada, fervendo-se por 5 minutos. Filtrou-se a solução resultante para um tubo de ensaio, o qual foi agitado vigorosamente por 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerada como resultado positivo.

4.2.4.2 Fenóis e Taninos

Em três tubos de ensaio adicionou-se 5 mL de solução-mãe e posteriormente 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de FeCl_3).

4.2.4.3 Flavonóides

Uma solução mãe foi preparada com 360 mg dos extratos secos e 72 mL de metanol. Utilizou-se um bastão de vidro para solubilizar o extrato ao solvente. Por conseguinte, foi realizada uma filtragem simples. Mediu-se 10 mL de solução mãe e colocou-se em três tubos de ensaio. Adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado, em cada um dos tubos.

Acrescentaram-se raspas de magnésio em cada tubo. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

4.2.4.4 Purinas

Em uma cápsula de porcelana, juntou-se 5 mg de extrato seco, 3 gotas de solução de HCl 6N e 2 gotas de H_2O_2 concentrado. Evaporou-se em banho maria. Adicionou-se 3 gotas de solução de NH_4OH 6N. O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

4.2.4.5 Glicosídeos cardiotônicos

Aqueceu-se 5,00g da droga vegetal em banho-maria juntamente com 50,00mL de etanol 70%. A solução resultante foi filtrada, realizando-se em seguida uma reação de precipitação para a retirada de possíveis interferentes utilizando-se 30,00mL de água deionizada e 15,00mL de solução de acetato de chumbo 10%, o qual foi filtrada novamente.

Adicionou-se, então 10,00mL de solução de fosfato ácido de sódio 10%, filtrando-se novamente após agitação. O filtrado foi transferido para funil de separação e extraído com 15,00mL de clorofórmio por duas vezes, juntando-se as fases orgânicas a qual foi evaporada até metade do volume.

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

4.2.5 Análises Físico-Químicas

4.2.5.1 Granulometria

Baseado na Farmacopéia Brasileira (1988), 25 g do material vegetal pulverizado foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas e coletor correspondentes a 0,074; 0,125; 0,177; 0,25 e 0,42 μm , utilizando tamisador vibratório, na escala oito do aparelho, durante 30 minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções. Este procedimento foi realizado em triplicata. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó das cascas pulverizadas recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Past onde foram calculadas as frequências percentuais, e também, as frequências percentuais cumulativas.

4.2.5.2 Determinação do teor de extrativos para a droga

Cerca de 1 g da droga vegetal foi pesado e submetido à decocção com 100 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL e a solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado, foi pesada uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro tarado e evaporado até seca em banho-maria, sob agitação ocasional (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1994). O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de cinco determinações segundo equação 1 mostrada abaixo:

$$TE = \frac{g * FD * 100}{m} \quad (1)$$

Em que: TE = teor de extrativos (%); g = massa do resíduo seco (g); m = massa da amostra (g); FD = fator de diluição

4.2.5.3 Determinação do pH

Foi preparada uma solução a 1% por infusão com a droga vegetal. Em erlenmeyer, 99 g de água foram colocados sobre uma chapa-elétrica para ebulir durante 5 minutos. Em seguida, a água foi vertida sobre a droga e o recipiente foi fechado e deixado em infusão por 15 minutos. Após este tempo, a mistura foi filtrada e arrefecida, procedendo-se à leitura em pHmetro calibrado em pH de 4 a 9. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados equivalem à média dessas medições (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.5.4 Determinação da densidade aparente não compactada

Uma proveta de 100 mL foi previamente pesada e, posteriormente, preenchida com a droga vegetal. A densidade aparente foi determinada com os dados de volume e massa, de acordo com os seguintes cálculos (equação 2):

$$Dap = \frac{Mpc - Mpv}{Vp} \quad (2)$$

Em que: Dap=densidade aparente; Mpv = massa da proveta vazia; Mpc = massa da proveta cheia; Vp = volume da proveta.

4.2.5.5 Perda por dessecação em estufa

Foram pesados 2 g da droga e colocados em “pesa-filtros” previamente tarados. Em seguida, foram levados até estufa a 105 °C por duas horas. Após esse tempo, os “pesa filtros”, contendo o material, foram mantidos para arrefecimento em dessecador por mais 30 minutos, e então, pesados. Depois dessa pesagem, os “pesa-filtros” foram colocados normalmente em estufa, repetindo o procedimento, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.5.6 Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco

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

4.2.6. Perfil Cromatográfico e Caracterização química

O extrato metanólico e a acetato de etila das folhas de *K. pinnata* foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent®, 1200 series) com detector UV DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 cm x 5 µm); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetoneitrila (8:2) concentração das amostras de 1 mg/mL, volume de injeção de 20 µL e temperatura da coluna de 25° C. A análise de cada amostra tiveram duração de 60 minutos, com *pós time* de 10 min entre as amostras. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 288 e 386 nm e nos espectros UV foram obtidos por varredura no UV (190 a 400 nm).

A frações diclorometância tive duração de 60 minutos, com *pós time* de 10 min entre as amostras. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 280 e 340 nm e nos espectros UV foram obtidos por varredura no UV (190 a 400 nm).

Para obtenção do perfil cromatográfico e caracterização química do extrato metanólico e frações, foram utilizadas como marcadores químicos na CLAE as seguintes substâncias fenólicas padrão (Sigma-Aldrich®): canferol, luteolina, e apigenina 7-O-β-D-

glicosídeo. Para as análises dos padrões foram empregadas as mesmas condições cromatográficas, incluindo a obtenção dos espectros por varredura no UV (190 a 400 nm). Após obtenção dos cromatogramas e espectros UV das amostras e marcadores químicos, a identificação das substâncias padrão nas amostras foi realizada por análise e comparação dos tempos de retenção dos picos nos cromatogramas e dos espectros UV.

A fração hexânica, por conter substâncias apolares, foi submetida à análise por Cromatografia com Fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas na plataforma analítica da Farmanguinhos (FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brasil) utilizando cromatógrafo a gás (CG) (Hewlett-Packard® 6890) equipado com coluna capilar de sílica fundida (HP-5, espessura do filme: 30m x 0,25mm, 0,25 µm), 60 min de duração da corrida, tendo o hélio como gás carreador com fluxo de 10 mL/min; temperatura inicial de 300 °C e máxima de 350 °C. A detecção foi realizada através de espectrômetro de massa (EM) (Hewlett-Packard® 5972), acoplado ao CG, com ionização eletrônica (IE) (70 eV e fonte de ion de 250 °C).

4.3. Tratamento Estatístico (pesquisa quantitativa)

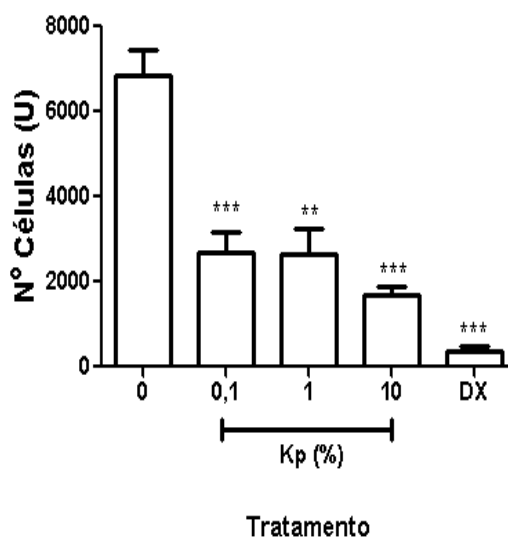
- **Estatística descritiva:** Os resultados foram representados em colunas correspondentes à média mais ou menos desvio padrão da média (\pm DPM) em gráficos de relação dose-efeito;
- **Estatística comparativa:** Análise de variância de uma via ANOVA seguida de teste Bonferroni para múltiplas comparações para confirmação ou negação da hipótese das diferenças entre os grupos experimentais estabelecendo-se como limite de confiança 95% para a desigualdade.

5. RESULTADOS E DISCURSÃO

5.1. Avaliação de atividade anti-inflamatória do extrato aquoso.

5.1.1. Efeito de *Kalanchoe pinnata* sobre a migração de células para o exsudato inflamatório

Figura 5- Efeito do extrato aquoso de *Kalanchoe pinnata* (i.p) administrado 1h antes da Carragenina (CG) 1% sobre os níveis de leucócitos no modelo de bolsa de ar induzida pela CG em ratos. Dados representados por média + EPM (n=3). *p<0,05; **p<0,01

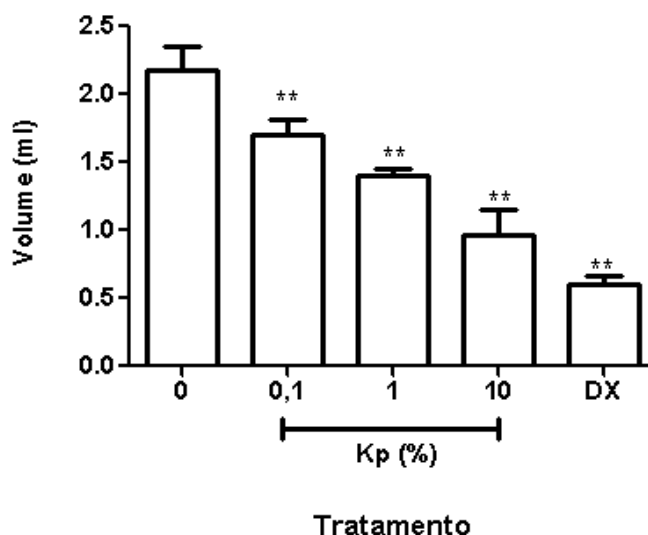


Fonte: Autor (2017)

A administração dos extratos (Kp 0,1, 1 ou 10 %) resultou em diminuição do número de células infiltradas no exsudato ocorreu sem, no entanto, perfil dose-dependente (ver figura 7). De acordo com a figura 5, a diluição de Kp à 10%, foi mais eficiente em provocar diminuição 75% da migração celular comparado ao animais controles (GC), e nas concentrações de 0,1% e 1%, houve uma diminuição de 61%.

5.1.2 Efeito de *Kalanchoe pinnata* sobre o volume de exsudato inflamatório.

Figura 6- Efeito do extrato aquoso de *Kalanchoe pinnata* (i.p) sobre os níveis de exsudação no modelo de bolsa de ar induzida pela CG em ratos. 0 – carragenina (1%) somente. DX (dexametasona - 600 µg/Kg, i.p. + CG (1%). Dados representados por média + EPM (n=3). *p<0,05; **p<0,01



Fonte: Autor (2017)

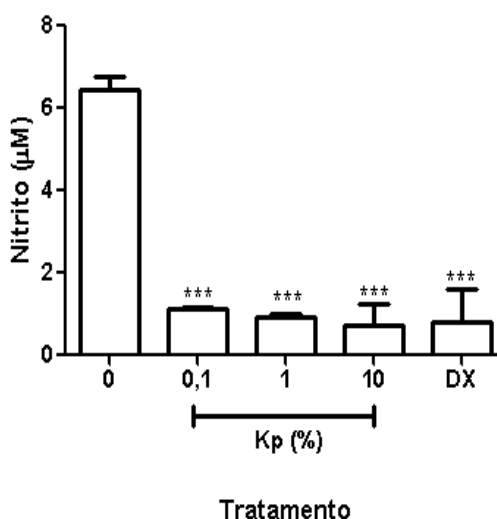
Ocorreu uma redução de 35% (Kp à 1%) e 55% (Kp à 10%) do volume de exsudato, formado em resposta à administração de carragenina, em relação ao grupo controle. Quanto à potência dos efeitos anti-inflamatórios de Kp comparados à dexametasona, a inibição na produção do volume de exsudato provocado pelas diluições de 0.1% e 1% foi de 66% do efeito da dexametasona, enquanto que a dose de Kp 10% foi mais eficiente: 80%, demonstrando um perfil dose-dependência (ver figura 7).

Desta forma a formação do exsudato inflamatório está associado ao aumento da permeabilidade vascular induzida por histamina e serotonina que são as primeiras aminas vasoativas liberadas nas reações inflamatórias agudas, permitindo assim a saída de líquido rico em proteínas e de células para o tecido intersticial (KUMAR, V. *et al* 2005). As primeiras células que migram através do endotélio para o local infectado são neutrófilos (entre 4-12 h) e posteriormente monócitos (entre 24-48 h). Os monócitos, ao serem ativados tornam-se macrófagos, que além de exercerem sua ação como células fagocíticas, participam na ativação dos linfonodos e assim, na proliferação de linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os resultados demonstram que, assim como a dexametasona, o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* reduziu o edema e migração de leucócitos, sendo eficaz na supressão do processo inflamatório induzido por carragenina.

5.1.3 Efeito de *Kalanchoe pinnata* sobre a produção de nitrito no exsudato inflamatório

Figura 7- Efeito de *Kalanchoe pinnata* sobre a produção de nitrito no exsudato inflamatório. Efeitos do extrato de *Kalanchoe pinnata* (i.p sobre a concentração de nitrito no exsudato em bolsas de ar de ratos tratados com carragenina (1%). Dados representados por média + EPM (n=3). *p<0,05; **p<0,01



Fonte: Autor (2017)

Com relação aos níveis de nitrito presentes no exsudato, observou-se uma acentuada inibição sendo da ordem de 81%, 84% e 87%, após os tratamentos de Kp 0,1%, 1% e 10%, respectivamente. Essa inibição foi similar àquela provocada pela dexametasona, sugerindo que Kp possa atuar diminuindo a resposta inflamatória via mecanismo dependente da inibição da produção de óxido nítrico.

A produção de nitrito no exsudato resulta da ativação da enzima sintase de óxido nítrico induzida (NOSi) que por sua vez aumenta a síntese de óxido nítrico (NO) é formado a partir do oxigênio molecular e da L-arginina (MONCADA *et al.*, 1991). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO, entre os quais as células endoteliais (WRIGT *et al.*, 1989), macrófagos (DI ROSA *et al.*, 1990), sinoviócitos (MCLNNES *et al.*, 1996) e condrócitos (STADLER *et al.*, 1992). O óxido nítrico é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas.

Essa inibição em dois parâmetros inflamatórios volume de exsudato e migração celular e que seu mecanismo de ação depende da inibição da atividade da NOS, observada na inibição de nitrito (NO) seu metabólito exclusivo pois a estimulação de óxido nítrico (NO) tem

como ação a inibição de citocinas inflamatórias ou impedir a produção de mediadores inflamatórios locais.

No caso da inflamação aguda gerada no modelo podemos dizer que a administração extrato aquoso de Kp confirmou relatos de outros estudos para efeitos anti-inflamatórios, e apontou que um mecanismo associado a inibição da produção de NO via nitrito (medida indireta), visto que na figura 8, houve uma diminuição de nitrito em todas as diluições testadas. O óxido nítrico modula reações inflamatórias agudas e crônicas e outros processos do sistema imunológico.

O papel do óxido nítrico na inflamação é um dos aspectos mais estudados na fisiologia nos últimos anos. Muitos estudos mostram um importante papel no NO como agente anti-inflamatório, entretanto muitos outros demonstram a participação dessa molécula como indutora de disfunções teciduais e da ativação de células inflamatórias. Esse aparente paradoxo pode ser entendido estudando-se a química fisiológica do NO e seu metabolismo determinando, assim, uma distinção entre os efeitos deletérios e benéficos desse composto (GRISHAM *et al.*, 1999).

A interação direta do NO com proteínas metálicas ou com radicais orgânicos livres representam as duas principais formas de efeitos biológicos deste composto nos sistemas biológicos (WINK *et al.*, 1997; PADMAJA, HUIE, 1993). Em constante, os efeitos indiretos são mediados por espécies oxidadas de nitrogênio altamente reativas, formadas pela reação do NO com O₂ e O₂⁻. Essas espécies estão associadas com a fisiopatologia de diversos modelos de inflamação (GRISHAM *et al.*, 1998; NATHAN, 1997; WINK, MITCHELL, 1998) e as mais significantes são óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO⁻), que induzem dois tipos de estresse químico: oxidação e nitrosação (WINK, MITCHELL, 1998).

Em relação aos níveis de nitrito presentes no exsudato, observou-se uma acentuada inibição. Essa inibição foi similar àquela provocada pela dexametasona, sugerindo que Kp possa atuar diminuindo a resposta inflamatória via mecanismo dependente da inibição da produção de óxido nítrico.

Como já foi relatado pequena molécula tem efeitos fascinantes desde a manutenção inicial da vida, através do controle da circulação placentária, como também efeitos letais consideráveis, por exemplo, no choque séptico. Além disso, sua atividade na imuno-regulação está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Em virtude dos resultados positivos no modelo de bolsa de ar e da complexidade química dos derivados vegetais, não se pode afirmar que a ação anti-inflamatória de *K. pinnata*

se dê por um único mecanismo de ação. A atividade anti-inflamatória de *K. pinnata* pode ser atribuída à presença de constituintes químicos, como o triterpeno α -amirina e os flavonoides canferol (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; OTUKI et al., 2005).

5.1.4 Efeitos de extrato aquoso de *Kalanchoe pinnata* (Kp) (tabela 3) sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos.

Tabela3- Efeito da *Kalanchoe pinnata* sobre os níveis plasmáticos de proteínas totais, albumina, ureia e creatinina. Dados apresentados por média \pm EPM (n=5-4). Valores de referência (1) Melo et al., 2012- Centro de Bioterismo da FMUSP (2008), referência (2) Dantas et al (2006).

Kalanchoe Pinnata

Parâmetros Bioquímicos plasmáticos	Grupos				Valores de Referência
	Controle	K.p 0,1% (0,01mg/kg)	K.p 1% (0,1mg/kg)	K.p 10% (1mg/kg)	
Proteínas Totais (g/dl)	7,4 \pm 0,16	6,96 \pm 0,29	7,3 \pm 0,7	5,7 \pm 0,52	5,2 - 10,4 (ref 1)
Uréia (mg/dl)	30 \pm 2,08	50,33 \pm 5,66	50,6 \pm 3,71	37,6 \pm 3,84	12,3- 51,0 (ref 2)
Creatinina (mg/dl)	0,4 \pm 0	0,46 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,4 \pm 0	0,4 a 0,64 (ref 1)
Albumina (mg/dl)	3 \pm 0,1	2,93 \pm 0,06	3,03 \pm 0,23	2,5 \pm 0,05	2,8 a 6,1 (ref 1)

Fonte: Autor (2017)

Não observamos diferenças nos níveis de proteínas totais presentes no plasma, pois o grupo controle apresentou níveis de 7,4 \pm 0,16 g/ dL, os grupos tratados com extrato aquoso de Kp nas diluições de 0,1% (0,01mg/kg), 1% (0,1mg/kg) e 10% (1mg/kg) apresentaram níveis de 7,3 \pm 0,7g/dL; 6,96 \pm 0,29 g/ dL e 5,7 \pm 0,52 respectivamente. Quanto aos níveis de albumina plasmática no grupo controle quantificamos 3 \pm 0,1mg/dL e nos grupo tratados 2,93 \pm 0,06 mg/dL (0,1%), 3,03 \pm 0,23 mg/dL (1%) e 2,5 \pm 0,05 mg/dL (10%). Por sua vez, a uréia é o principal produto formado no catabolismo de proteínas e aminoácidos, embora, o grupo controle tenha apresentado níveis de uréia de 30 \pm 2,08 g/dL e os grupos tratados apresentado níveis de 50,33 \pm 5,66 g/dL (0,1%), 50,66 \pm 3,71 g/dL (1%) e 37,66 \pm 3,84 g/dL (10%), esses valores estão dentro da variação esperada, segundo outros autores. Os níveis de creatinina não mostraram diferenças significativas entre os grupos, sendo que o grupo controle apresentou

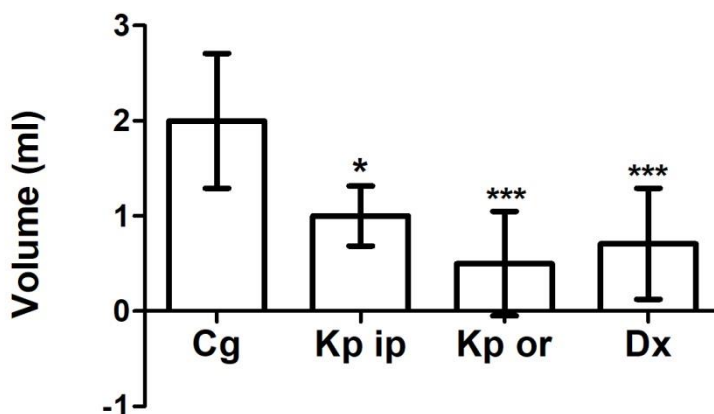
níveis de $0,4 \pm 0$ mg/dL e os grupos tratados com Kp $0,46 \pm 0,03$ mg/dL (0,1%), $0,43 \pm 0,03$ mg/dL (1%) e $0,4 \pm 0,03$ mg/dL (10%). Caso houvesse uma elevação da creatinina plasmática seria traduzida como possível insuficiência renal aguda, que é referida na literatura como decorrente de diminuição do fluxo sanguíneo renal, que leva a uma disfunção renal.

5.1.5. Atividade Anti-Inflamatória do extrato metanólico de Kp

A atividade anti-inflamatória de produtos naturais tem sido relacionada a substâncias fenólicas, especialmente aos flavonoides, bem como aos agentes antioxidantes que, através de diferentes mecanismos, inibem os processos inflamatórios. Neste sentido, a hipótese da atividade anti-inflamatória do extrato metanólico, rico em substâncias flavonoídicas, em modelo de inflamação também foi testada.

A injeção de carragenina nos grupos de animais tratados induziu uma inflamação aguda, caracterizada pela formação de um exsudato e migração de leucócitos para a cavidade intraescapular. Desta forma, a coadministração a administração com extrato metanólico na dose de 400 mg/Kg dos extratos nas duas vias de administração via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p.) reduziu significativamente o volume do exsudato inflamatório ($p < 0,01$) (figura 8) e a migração celular porém não houve diferenças significativa na migração dos leucócitos comparado com o grupo padrão dexametasona ($p > 0,05$) Da mesma forma, os animais tratados com o anti-inflamatório dexametasona (5 mg/ kg-1) reduziu o exsudato ($p < 0,001$) e também não modificou a migração celular comparados a dexametasona. (Figura 9).

Figura 8-. Efeito da *Kalanchoe pinnata* sobre o acúmulo de exsudato induzido pela injeção de carragenina (Cg) em ratos wistar, machos (180-220 g) em duas vias de administração. Cada ponto representa o volume médio de exsudato \pm EPM * $p < 0,001$ e # $p < 0,01$, comparando com o grupo controle

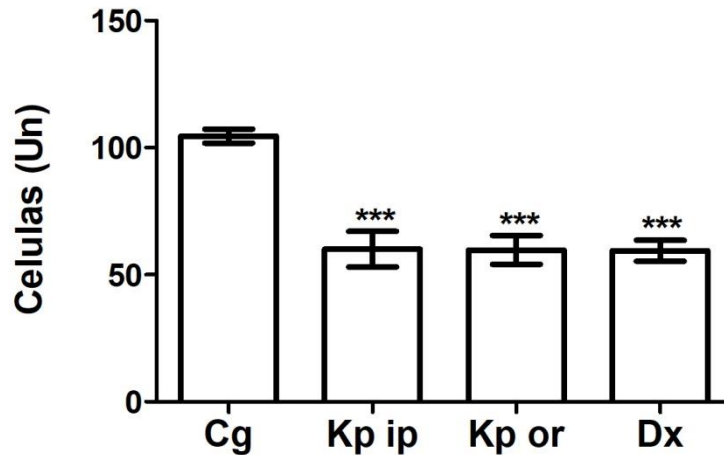


Fonte: Autor (2017)

Portanto, o efeito anti-inflamatório da espécie foi confirmado pelo modelo de bolsa de ar que demonstrou que as espécies *Kalanchoe pinnata* na dose 400mg/Kg causaram a inibição da resposta inflamatória aguda verificada por meio da diminuição significativa do volume do exsudato comparada com o grupo controle além de demonstrou significativo efeito sobre a migração dos leucócito na administração oral do extratos. Verificou-se também que a atividade anti-inflamatória da espécie estudada se assemelha com a dexametasona, pois não existe diferença estatística entre elas ($p < 0,05$).

Diferentes mecanismos envolvem o início da reação inflamatória. O desenvolvimento da resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizado em sua fase inicial (0-1 hora) pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6 horas) está correlacionada com a elevação da produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e mais recentemente a liberação de NO (óxido nítrico), na resposta inflamatória. As drogas anti-inflamatórias não esteroidais como a dexametasona age em receptores nucleares, estimula a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina que inibe a PLA2 e, conseqüentemente, a produção de PGs. Além disso, inibe a síntese de COX, potencializando o efeito. Constituintes do extrato metanólico, principalmente os flavonoídicos, exercem mecanismo de ação parecido com a dexametasona (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). (LIMA, K.V.B.João Pessoa, p 14-32, 1999; CRUNKHORN P., MEACOCK S.C.1971.; NIEMEGEREERS,C.J.; VERBRUGGEN, F.J.; JANSSEN, P.A.,1964).

Figura 9- Contagem global de leucócitos no exsudato inflamatório de ratos, 16 horas após a injeção de carragenina. houve diferenças significativas em comparação ao controle (Carragenina + solução salina), obtido por meio da ANOVA, teste de Tukey, $p > 0,05$.



Fonte: Autor (2017)

5.2. Análises Fitoquímicas

5.2.1. Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários

Os processos de prospecção fitoquímica são de extrema importância, pois permitem identificar quais classes de metabólitos secundários e/ou princípios ativos estão presentes em determinada amostra vegetal e, a partir daí, orientar a extração e/ou fracionamento de extratos para isolamento de compostos de maior interesse. Muitas substâncias, quando tratadas com determinados reativos, apresentam reações de coloração e/ou precipitação características, que permitem a identificação das amostras que as contêm. As plantas produzem diferentes substâncias químicas e o fazem em diferentes proporções, dependendo do hábitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climato-edáficas. Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação.

Os dados da triagem fitoquímica, realizada com as folhas pulverizadas *Kalanchoe pinnata* (Tabela 04), revelaram os fenóis e taninos, as saponinas, os flavonoides e os Glicosídeos cardiotônicos como grupos de substâncias químicas que podem ser empregadas para a caracterização da matéria-prima. Vale ressaltar que para que fique caracterizada a

presença de determinado grupo de substância química na amostra, todos os testes executados devem ser positivos.

Tabela 4- Triagem fitoquímica das folhas de *Kalanchoe pinnata*

Metabolitos Secundários	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Saponinas	Positivo (+)
Fenóis e Taninos	Positivo (+)
Flavonóides	Positivo (+)
Purinas	Negativo (-)
Glicosídeos cardiotônicos	Positivo (+)

Fonte: Autor (2017)

Em *K. pinnata*, os testes foram positivos para fenóis e taninos, flavonoides e glicosídeos cardiotônicos. A ocorrência de glicosídeos cardiotônicos já havia sido descrita por Smith (2004), bem como a ocorrência de flavonoides por Muzitano *et al.* (2006) e Muzitano *et al.* (2009). Deve-se fazer a ressalva de que os glicosídeos cardiotônicos geralmente possuem índice terapêutico bastante baixo, tendo potencial como agente tóxico fatal. Por essa razão, a utilização desta planta na medicina popular não deve ser indicada antes que sejam realizados testes toxicológicos que garantam sua segurança ou, ainda, que tais compostos sejam isolados e não façam parte do conjunto de substâncias a serem utilizadas pelo indivíduo, sendo que este processo deve ser realizado por profissionais capacitados.

As saponinas, presentes majoritariamente em *K. pinnata*, possuem caráter anfifílico e formam complexos com proteínas, conferindo a elas a capacidade de precipitar e coagular as células sanguíneas vermelhas, auxiliando a cessar o sangramento. Taninos condensados e taninos hidrolisáveis também formam complexos com proteínas, que podem potencializar a cura de feridas, queimaduras e mucosas inflamadas, formam uma proteção sobre o local e permitem que o processo de cura proceda naturalmente. O cálcio, elemento abundante na espécie, é importante no processo de coagulação, de acordo com sua concentração extracelular (OKWU; JOSIAH, 2006; SANTOS; MELLO, 2003; SCHENKEL *et al.*, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003).

5.2.2. Determinação das características físico-químicas do pó das folhas

5.2.2.1 Granulometria

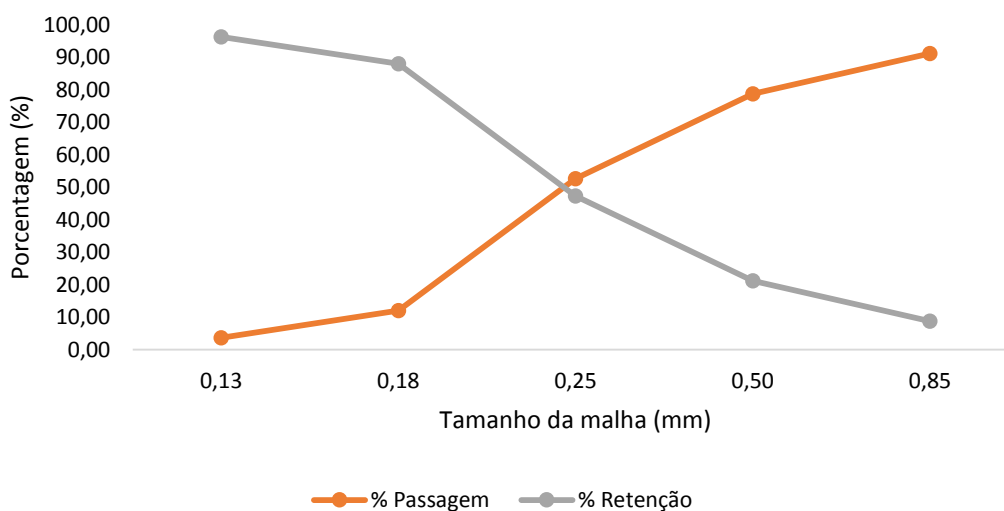
Os resultados da avaliação da granulometria estão apresentados no Gráfico da Figura 11, o qual revela um diâmetro médio de partículas de $0,250 \text{ mm} \pm 0,2823$.

Tabela 5- Avaliação da granulometria da amostra

Tamanho da malha (mm)	% Passagem	% Retenção
0,125	3,66	96,34
0,18	12,01	87,987
0,25	52,66	47,34
0,5	78,79	21,21
0,85	91,18	8,82

Fonte: Autor (2017)

Figura 10- Gráfico de diâmetro médio das partículas



Fonte: Autor (2017)

Inicialmente, foi determinada a granulometria da droga para sua padronização, a fim de otimizar os processos extrativos (SONAGLIO *et al.*, 2004). A granulometria, que é o grau de divisão de pós, é expressa em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPÉIA, 1988). Segundo a literatura (LIST e SCHMIDT, 2000), a droga pulverizada

que apresente partículas de tamanho superior à classificação de fino é mais adequada para os processos de extração.

5.2.2.2 Determinação do teor de extrativos para a droga

O ensaio do teor de extrativos (TE) indica a quantidade de substâncias extraíveis, ou seja, solúveis em determinado sistema solvente. É um método empregado na seleção do solvente mais adequado à extração das substâncias de interesse de uma planta ou como indicativo para o ajuste da quantidade de matéria-prima a ser utilizada visando uma concentração final da substância de interesse no produto da extração. Neste estudo, o teor de extrativos da droga vegetal foi empregado exclusivamente como um ensaio auxiliar na caracterização físico-química, visto que se trata de um parâmetro importante no controle de qualidade da matéria-prima vegetal. O valor de TE encontrado para a droga vegetal em estudo foi de 70 % (m/m).

5.2.2.3 Determinação do pH

Em relação ao pH do pó das folhas pulverizadas de *K. pinnata*, apresenta-se o valor da média de três determinações na Tabela 6. O valor do pH da água destilada foi de 6,08.

Tabela 6- Determinação de pH

Ph da água destilada	Média do valor de pH ± DP
6,08	6,47 ± 0,01

Fonte: Autor (2017)

Uma das importâncias do pH nos vegetais está no mecanismo de formação de ATP, que é impulsionado por uma força próton-motriz durante a fotofosforilação nos cloroplastos (STRAYER, 1996). O ATP é uma molécula de alta energia, que acopla reações não favoráveis no interior das células. Entre essas reações, estão aquelas que fazem parte da biossíntese de enzimas importantes no metabolismo secundário (STRAYER, 1996). As alterações metabólicas provocadas por reações de óxido-redução podem modificar o pH das células vegetais, promovendo desvio das rotas metabólicas normais (STRAYER, 1996). De acordo com os dados da Tabela 3, encontrou-se um pH médio de 6,47 na amostra de *K. pinnata*, conferindo-a um caráter quase neutro.

5.2.2.4 Determinação da densidade aparente não compactada

A Tabela 7 apresenta os valores das três determinações, em g/mL, da densidade aparente não compactada das folhas pulverizadas de *K. pinnata*.

Tabela 7- Densidade aparente de três amostras de cascas pulverizadas de *K. pinnata*.

Amostras	Proveta Cheia (g)	Proveta (g)	Densidade (g/mL)
Amostra 1	65,15	41,59	0,4908
Amostra 2	68,42	42,38	0,5208
Amostra 3	70,50	41,30	0,5509

Fonte: Autor (2017).

A densidade aparente não compactada média encontrada foi de 0,520833 g/mL \pm 0,03005.

5.2.2.5 Determinação da perda por dessecação

O parâmetro que auxilia a caracterização da droga é representado pela perda por dessecação, que está ligada à estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua susceptibilidade ao desenvolvimento de bactérias e fungos, e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992). A variabilidade nos valores pode ser reduzida, desde que haja padronização nos parâmetros de plantio, coleta, armazenagem e tratamento prévio da droga utilizada. A perda por dessecação pode fornecer dados acerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes (HARBORNE, 1993). Além do mais, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento. A determinação da perda por dessecação mostrou que a droga vegetal apresenta valores dentro dos parâmetros com relação à umidade, que deve variar de 8 a 14%, com relação à maioria das drogas vegetais constituídas de sumidades floridas (FARMACOPÉIA, 2000).

A média da massa perdida total, após todas as pesagens, foi de 1,17g. Assim, foi obtida uma perda por dessecação de 11,67% \pm 0,489107224 em massa da amostra inicial do pó das folhas pulverizadas de *K. pinnata*.

5.2.2.6 Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco

O resíduo sólido do vegetal fresco indica haver grande quantidade de água no vegetal (cerca de 88,33%). Por isso, é importante observar que as folhas destas espécies devem ser submetidas à secagem o quanto antes, considerando-se o momento da colheita, garantindo assim a pronta estabilização de possíveis reações de degradação metabólica dos princípios ativos. Contudo, essa secagem não deve ser efetuada em temperaturas elevadas por não se conhecer a termo labilidade dos metabólitos secundários. Sugere-se, portanto, o uso de estufas com circulação de ar, pois nestas o ar saturado é constantemente insuflado para o exterior da câmara de secagem, acelerando o processo. Assim, foi obtida uma perda no valor de 11,67% \pm 2,287483545 em massa da amostra inicial do pó das folhas pulverizadas de *K. pinnata*.

5.2.3. Perfil Cromatográfico e Caracterização Química

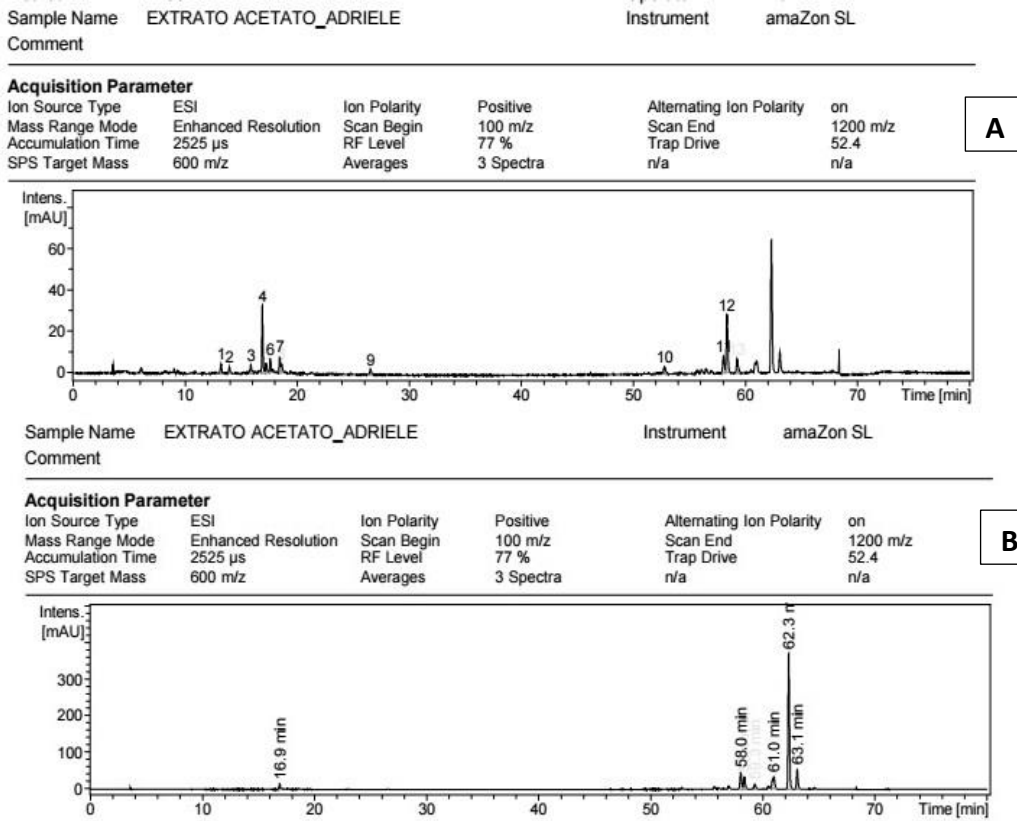
Conforme as figuras 11 e 14 os cromatogramas das frações obtidas a partir dos extratos brutos das folhas *K. pinnata* demonstraram que a fração metanólica e acetato de etila apresentaram a presença de dois picos majoritários, no tempo de retenção próximo de 20,00 minutos, e a partir desses aspectos visuais foi feito o fracionamento em coluna cromatográfica do extrato acetato de etila e extrato MeOH-1 além da utilização de padrões em CLAE para identificação de substâncias.

Para maior precisão da identificação de possíveis substâncias os extratos foram analisados e comparados em comprimento de ondas de 288nm e 386 nm (figura 11-A).

Na figura 11 são mostrados os cromatogramas da fração em acetato de etila das folhas de *K. pinnata* em 288 nm e 386 nm. O pico 1 (Figura 11 A), com tempo de retenção (tr)16,09 min (em 386 nm), produziu espectros de ultravioleta com bandas características do flavonoide canferol (Figura 12 B).

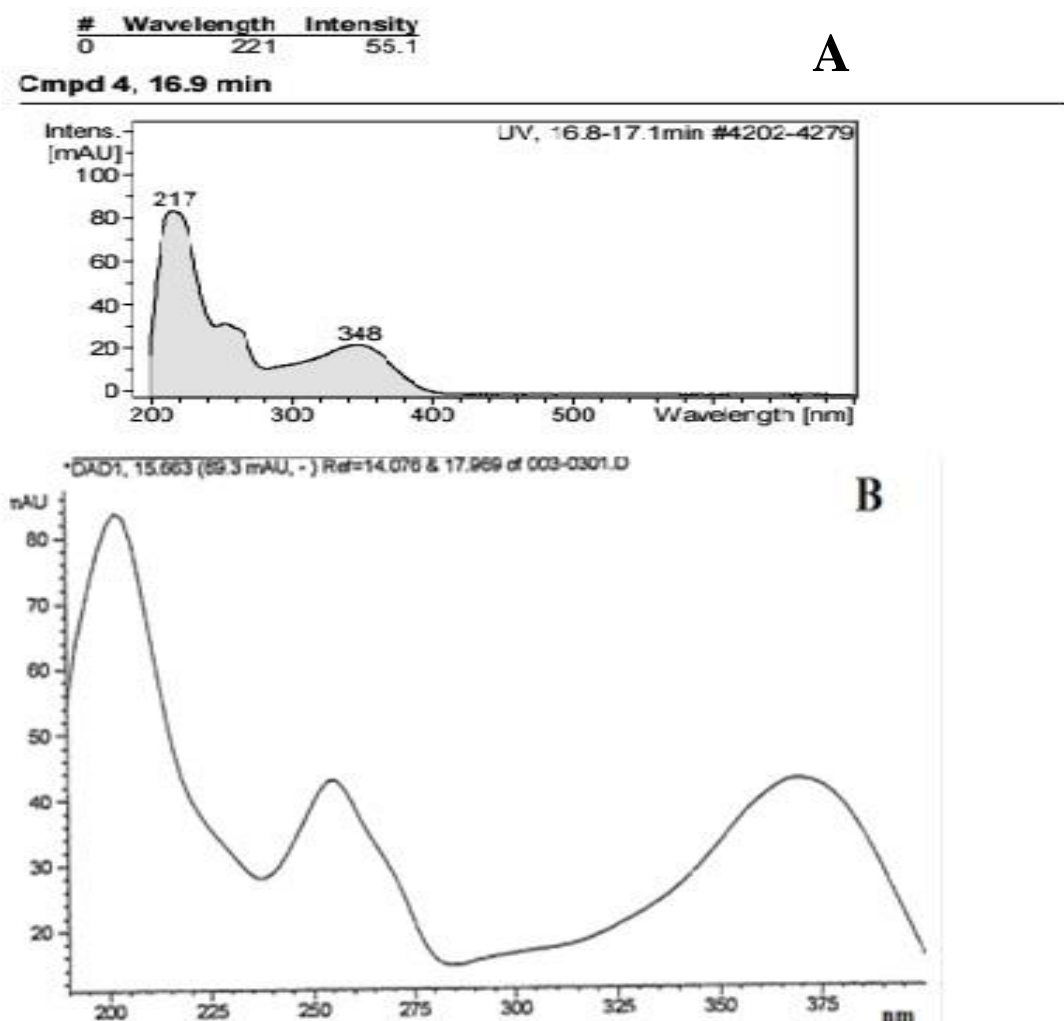
Após análise dos padrões para confirmação, nas mesmas condições, considerando o tempo de retenção e as características das bandas dos espectros de UV da substância padrão canferol (tr 15,54 min em 386 nm) (Figura 12 B) foi possível identificá-la na fração em acetato de etila.

Figura 11- Perfis cromatográficos do extrato acetato das folhas de *K. pinnata* por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas



Cromatogramas obtidos em 288 (A) e 386 nm (B)
 Fonte: O autor (2017)

Figura 12- Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma do extrato acetato e do padrão químico Canferol



Pico 1 (A), Canferol (B)
Fonte: Autor (2017)

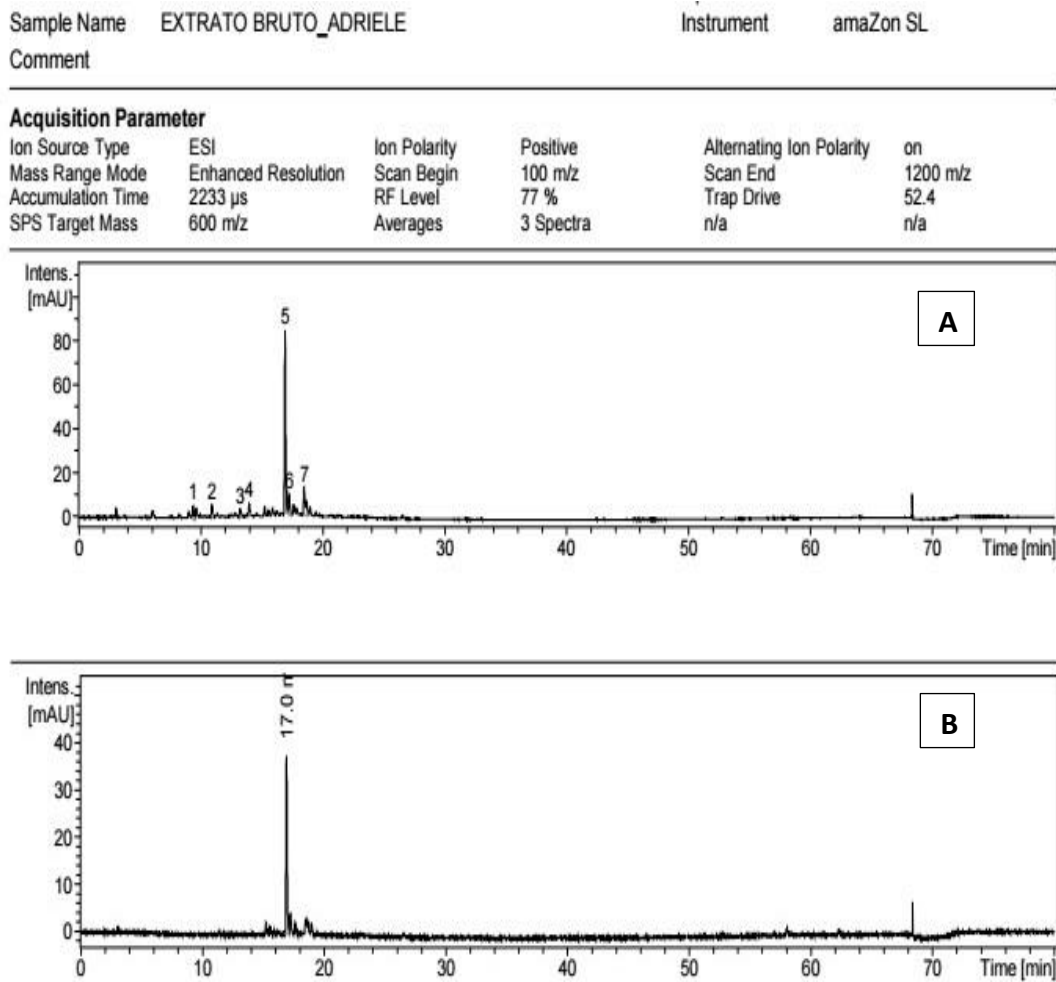
Cromatogramas da fração metanólica das folhas de *K. pinnata* obtidos em 288 (A) e 386 (B) nm são mostrados na Figura 13. O espectro de ultravioleta obtido a partir do pico 1, com tr 17,00 min (em 386 nm), apresentou bandas correspondentes ao flavonoide canferol (Figura 14 B.)

Para comprovar a presença dos flavonoides detectados com base no perfil cromatográfico, tempo de retenção e espectro de ultravioleta, padrões foram aplicados e analisados.

Após avaliação, o canferol apresentou perfil cromatográfico com tr 16,9 min (em 386 nm), muito semelhante ao detectado na fração acetato de etila sendo o tempo de retenção para ambos bastante próximos. (Figura 11).

Presença de flavonóis (canferol) podem exercer efeito anti-inflamatório por meio de inibição da PLA₂, COX, LOX e iNOS, fortalece essa hipótesemecanística (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

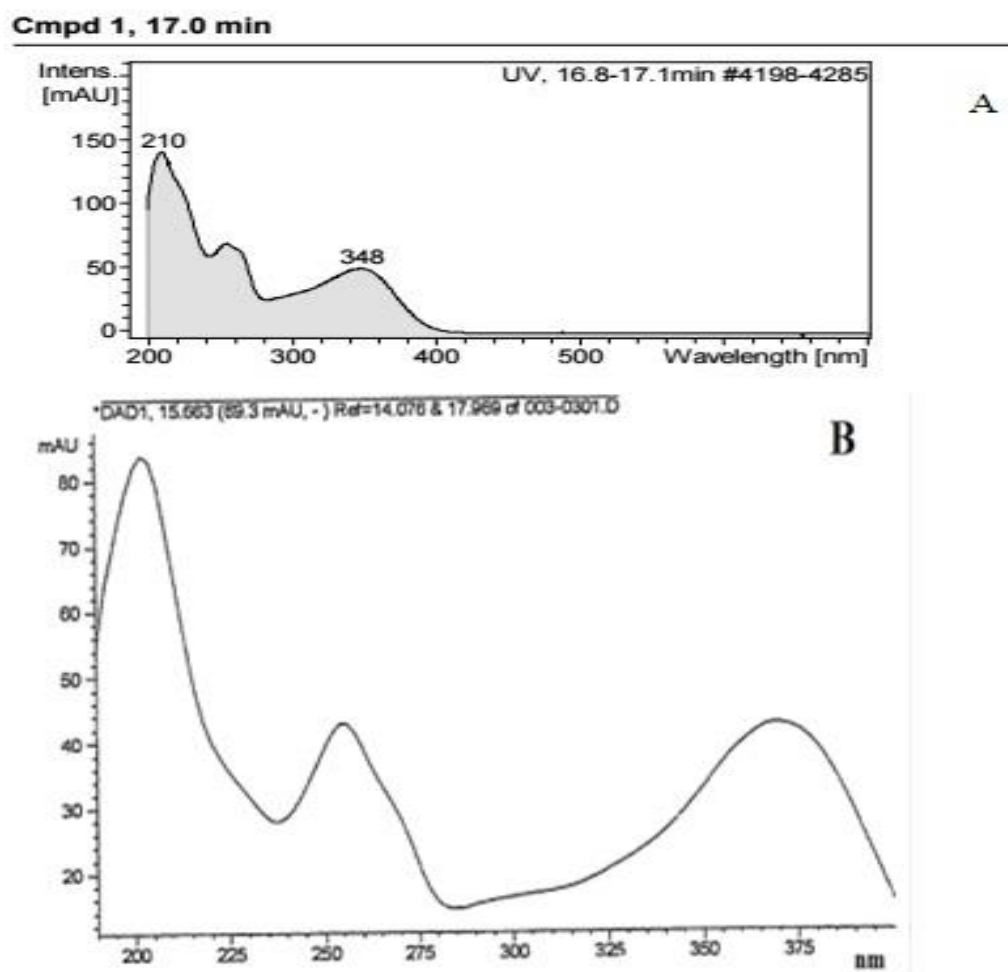
Figura 13- Perfis cromatográficos do extrato metanólico das folhas de *K. pinnata* por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas



Cromatogramas obtidos em 288 (A) e 386 nm (B)

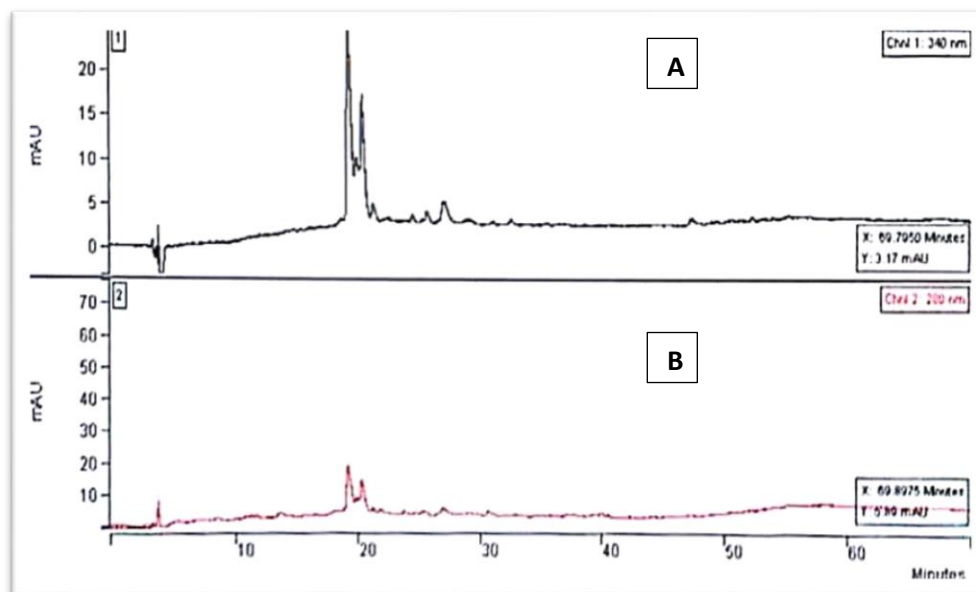
Fonte: O autor (2017)

Figura 14- Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma do extrato acetato e do padrão químico Canferol



Pico 1 (A), Canferol (B)
Fonte: Autor (2017)

Figura 15- Perfis cromatográficos do extrato diclorometano das folhas de *K. pinnata* por CLAE UV obtidos em diferentes comprimentos de ondas



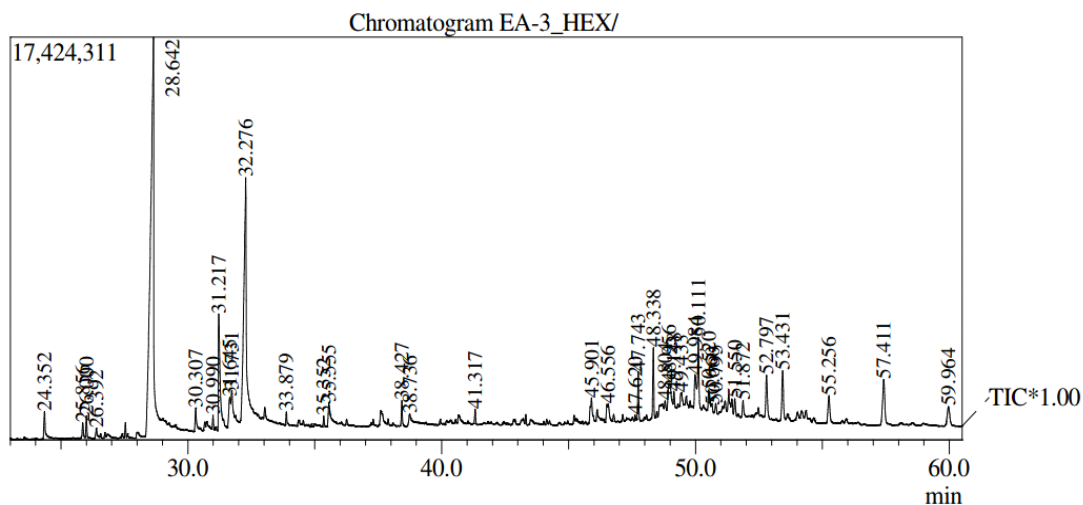
Cromatogramas do extrato diclorometano em 340 (A) e 280 (B) nm

Fonte: Autor (2017)

Na figura 15 estão representados os cromatogramas da fração diclorometânica das folhas de *K. pinnanta* em 340 (A) e 280 (B) nm. Nas condições cromatográficas empregadas, nenhum espectro característico de substâncias foi detectado, pois o mesmo não conferiu com nenhum padrão aplicado e pelo espectro pode-se inferir que a presença de substâncias é minoritária dada a observância do cromatograma em 340 nm.

Na Figura 16 é mostrado o perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de *K. pinnata* obtido por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os picos majoritários foram observados nos tempos de retenção de 28,31 e 32 minutos.

Figura 16- Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de *K. pinnata* obtido por CGEM.



Fonte: Autor (2017)

Os constituintes químicos com maior abundância encontrados na fração hexânica foram o ácido hexadecanóico (palmitato de etila - 38,58%), éster de etila do ácido 9, 12 octadecadienóico (linoleato de etila - 1,50%), éster de etila do ácido 9,12,15- octadecanóico (ácido oleico - 17,70%) e 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Phytol 5,71%) (Tabela 8). Os componentes identificados totalizaram 86,59%, enquanto os não identificados foram 13,41%. Os espectros de massas da α -amirina e β -amirina (banco de dados) e do pico nos quais elas foram identificadas na fração hexânica estão representados na Figura 17 e 18 e as fórmulas estruturais da α -amirina e β -amirina são apresentadas na Figura 19.

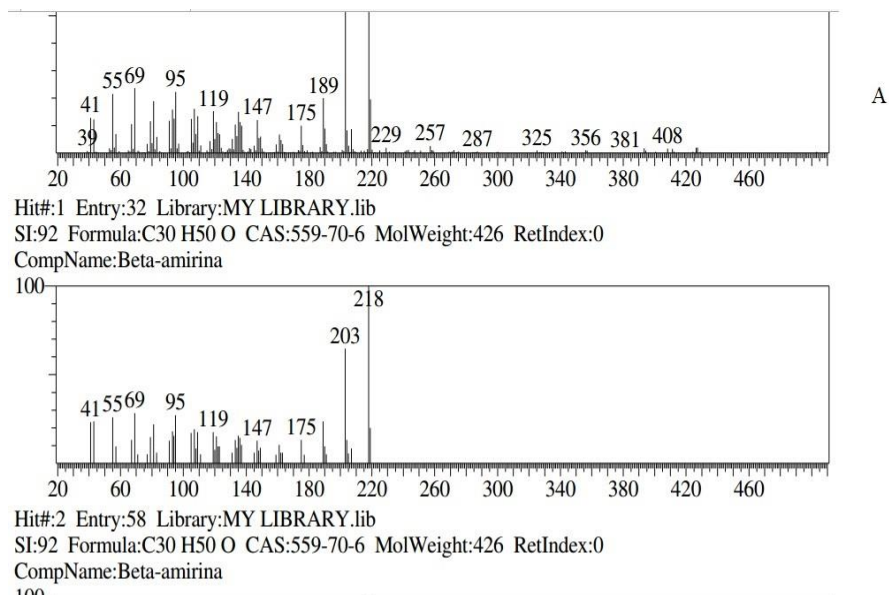
Tabela 8- Constituintes químicos da fração hexânica obtidos das folhas de *K. pinnata* por CG-EM.

Constituintes Químicos	Tempo de retenção (min)	Concentração (%)
Ácido hexadecanóico	28,642	10,46
Ácido tetradecanóico	24,352	0,95
Neofitadieno	25,856	0,49
Ácido pentadecanóico	26,392	0,29
2-Metil-tricosane	30,990	0,40
Éster de etila do ácido 9, 12-octadecadienóico	31,645	1,5
Éster de etila do ácido octadecanóico	32,276	12,70
Octadecanal	47,743	1,53
Pentacosane	48,338	2,22
Ácido Eicosanoico	35,555	0,84

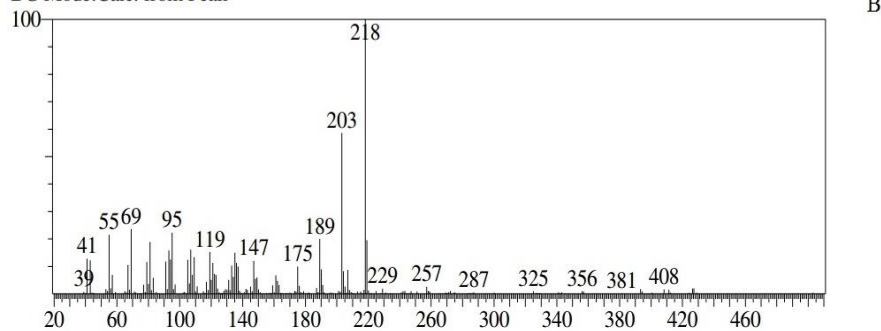
Vitamina E	46,556	5,88
Tetracosano	45,901	0,57
Ácido araquídico	38,736	0,84
8-Heptadeceno	31,731	1,42
Éster de etila do ácido hexadecanóico	49,148	1,06
4,8,12,16-Tetrametilheptadecano	35,352	0,24
Beta-amira	49,433	5,87
Alfa- Amirina	49,984	31,93
Octecanal	50,111	2,84
Éster octadecil do ácido Hexadecanóico	51,550	0,56
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	31,217	5,71
Àcido triacontanóico	48,804	0,35
Sitosterol	48,956	1,94
Ácido Acetiltributilcitrato	33,879	0,32
Ácido Benzeno-1,3-dicarboxílico	41,317	0,43
Ácido Benzeno-1,2-dicarboxílico	38,427	0,72
Ácido icosanoico	30,307	0,75
Phytone	26,000	0,61

Fonte: Autor (2017)

Figura 17- Espectros de massas da β -amirina do banco de dados (A) e do pico no qual ela foi identifica na amostra (B)

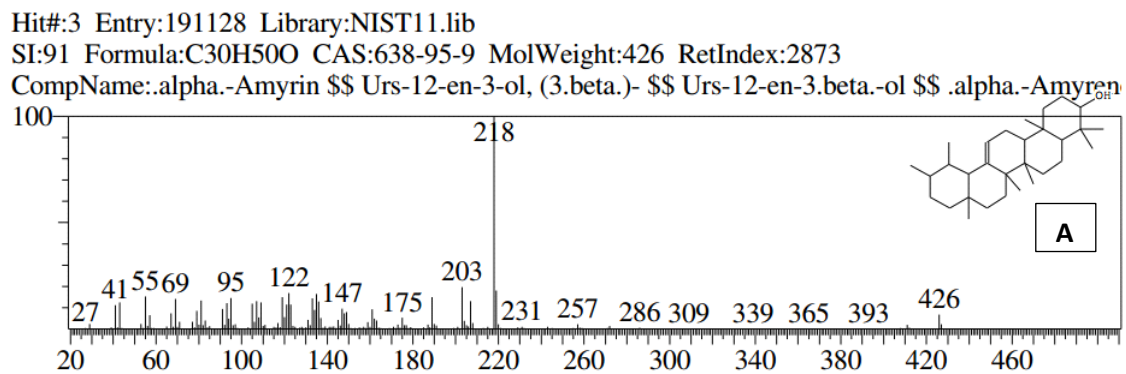


Line#:26 R.Time:49.435(Scan#:9088) MassPeaks:193
 RawMode:Averaged 49.430-49.440(9087-9089) BasePeak:218.15(81834)
 BG Mode:Calc. from Peak

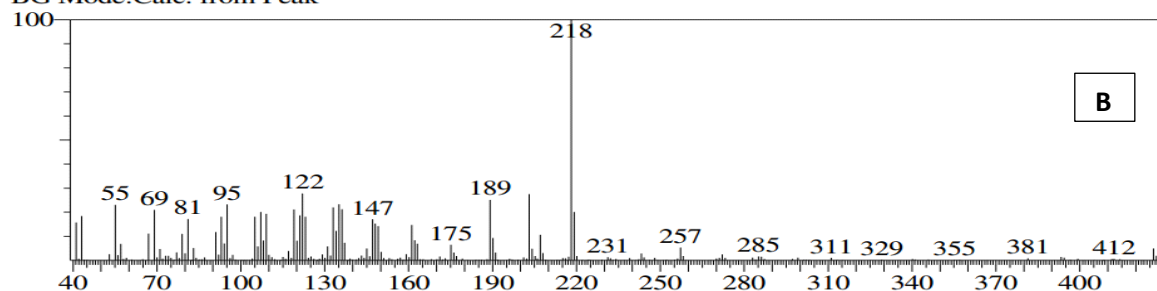


Fonte: Autor (2017)

Figura 18- Espectros de massas da α -amirina do banco de dados (A) e do pico no qual ela foi identifica na amostra (B).



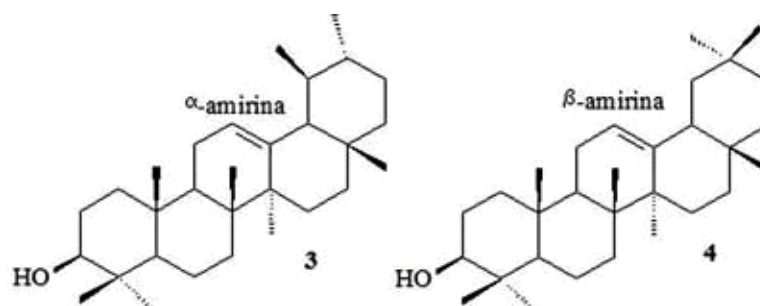
Line#:27 R.Time:49.985(Scan#:9198) MassPeaks:209
RawMode:Averaged 49.980-49.990(9197-9199) BasePeak:218.15(119312)
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:49 Library:MY LIBRARY.lib
SI:96 Formula:C30 H50 O CAS:638-95-9 MolWeight:426 RetIndex:0
CompName:Alfa-amirina

Fonte: O autor (2017)

Figura 19- Fórmulas estruturais da α -amirina e β -amirina.



Fonte: Autor (2017).

A análise em CG-EM da fração hexânica admitiu a presença de metabólitos apolares, como alguns ésteres graxos; α -tocoferol (vitamina E), substância com potencial antioxidante, que tem estrutura relacionada com as quinonas terpênicas do tipo plastoquinonas; e o triterpeno pentacíclico α -amirina, que possui diferentes bioatividades, como potencial antioxidante e anti-inflamatório (DEWICK, 2009; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011). Os triterpenos pentacíclicos, pelo menos a maior parte deles, pertencem às subclasses ursano, oleano e lupano. A presença de β -amirina (esqueleto olean-12-eno) e a presença da α -amirina (esqueleto ursan-12-eno), que são isômeros constitucionais, já teve presença relatada em *K. pinnata* (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; FERNANDES, 2011; SIDDIQUI *et al.*, 1989; SILVA, 2007).

Em pesquisas realizadas recentemente, a α -amirina demonstrou atividade anti-inflamatória quando avaliada em modelos de inflamação tópica, diminuindo a formação de edema, o influxo de neutrófilos e a expressão de IL-1 β (Otuki *et al.*, 2005b). Ademais, a mistura dos dois triterpenos (α,β -amirina) produziu antinocicepção em nível periférico, espinal e

supra-espinhal em camundongos, provavelmente por inibir as proteínas quinases A e C (Otuki et al., 2005). Foi demonstrado que a diminuição dos níveis de prostaglandina E2 (PGE2), através do bloqueio da expressão da ciclooxygenase-2 (COX-2), via inibição das proteínas quinases e bloqueio da ativação do NF- κ B, parecem representar os principais mecanismos envolvidos nas ações anti-inflamatórias tópicas da α -amirina (Medeiros et al.,2004). Além disso, considerando o estresse oxidativo induzido pela carreginina, à presença de flavonoides com atividades antioxidante e anti-inflamatória em *K. pinnata*, podem justificar o efeito anti-inflamatório por inibição das vias do TNF- α -NO e COX-II-PGE2 (GOKBULUT et al., 2013; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; MUZITANO et al., 2006; MAJAZ et al., 2011; BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012; LEE et al., 2013).

Estudos comprovam que flavonoide identificado no extrato metanólico e acetato de *K. pinnata*, bem como a α -amirina, possam contribuir para a ação anti-inflamatória pela inibição da via do AA (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; LEE et al., 2013).

CONCLUSÃO

O ensaio experimental de indução de inflamação via carragenina em bolsa de ar indicou que tanto o extrato aquoso como o extrato metanólico bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata* contém propriedades anti-inflamatórias, sendo que a administração por via oral do extrato metanólico foi mais eficiente para inibir ambos os parâmetros de volume de exsudato e migração leucocitária. A inibição nitrogénica sugere possível inibição da produção de óxido nítrico (NO). O flavonoide bioativo canferol foi identificado nos extratos metanólico e acetato por CLAE-UV e outra classe de β -amirina e α -amirina com picos identificados na fração hexânica por CG-EM. Os resultados evidenciam que a espécie tem o potencial alvo para o desenvolvimento de formulações fitoterápicas, resultando assim novas possibilidades terapêuticas para a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Elsevier, 2008, 576 p.

ADESANWO, J.K.; RAJI, Y.; OLALEYE, S.B.; ONASANWO, S.A. Antiulcer activity of methanolic extract of *Bryophyllum pinnatum* in rats. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 409-412, 2007.

AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M. AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F.; Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v.83, p.853- 858, 2012.

AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 853-858, 2012.

AKINPELU, D.A. **Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves**. *Fitoterapia*, v.71, p.193-194, 2000;

AKINSULIRE, O.R.; AIBINU, I. E.; ADANIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, T.; ADUGBEMI, T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, v.4, n. 3, p. 338-344. 2007;

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Advances in Rheumatology*, v. 81, n.1, p. 1-28, 1997.

ALMEIDA, A. P.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; 1-Octen-3-O- α -L-arabinopyranosyl- β -glucopyranoside, a minor substance from the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 485-489, 2006.

ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; SOUZA, M.L.M.; LIMA, L.M.T.R.; ROSSIBERGSMANN, B.; GONÇALVES DE MORAES, V.L.; COSTA, S.S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent Lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, v.66, p.134-137, 2000.

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; HOSEN, S. M. Z; UDDIN, R.; RAHAMAN, M. S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). **African Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 5, n. 10, p. 1258-1262, 2011.

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U. K.; SHILL, M. C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* Linn. (Family: Crassulaceae) leaves and stems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n.10, p. 2605-2609, 2011;

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U. K.; SHILL, M. C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* Linn. (Family: Crassulaceae) leaves and stems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n.10, p. 2605-2609, 2011.

BRAGA, R.; Plantas do Ceará. Revista do Instituto do Ceará, p. 229, 1951.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas medicinais de interesse ao SUS**. Disponível em: *Bryophyllum pinnatum*. Pharmacologyonline v.2, p. 873-886, 2009;
BUTCHIER, E.C. Leucocyte – endothelial cell recognition: three or more steps to diversity and sensitivity. *Cell*, v. 67, p.1033, 1991.

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. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAPOBIANCO, J.P.R., VERÍSSIMO, A., MOREIRA, A., SAWYER, D., SANTOS, I.P., PINTO, L.P. 2001. **Biodiversidade na Amazônia brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios**. Estação Liberdade: Instituto Sócio ambiental, São Paulo;

CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. **Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP**, 2008. Disponível em:
http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim
m. Acessado em 10/05/2017.

CHOI, S. J.; TAI, B. H.; CUONG, N. M.; KIM, Y. H.; JANG, H. D. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*). **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 587-595, 2012.

COSTA, A.F. Farmacognosia. 3v. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

COSTA, A.F. Farmacognosia: farmacognosia experimental. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3, p. 303, 308-309; Determinação do resíduo sólido de vegetal fresco. Métodos de preparação de forma farmacêutica básica. In: FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. Métodos gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. parte. I, p. X-1

COSTA, S.S; MUZITANO, M. F.; CAMARGO, L. M.; COUTINHO, A. S. M. Therapeutic Potential of *Kalanchoe* Species: Flavonoides and other Secondary Metabolites. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 12, p. 2151-2164, 2008.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRUNKHORN, P., MEACOCK S.C. Mediators of inflammations induced in the rat paw by carrageenan. **British Journal of Pharmacology**, v.1, n.42, p. 392-402, 1971.

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, n. 4, p. 1434-1441, 2011.

CRUZ, E. A.; DA-SILVA, S. A. G.; MUZITANO, M. F.; SILVA, P. M. R.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract 12 and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1616-1621, 2008.

CRUZ, E.A.; REUTER, S.; MARTIN, H.; DEHZAD, N.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B.; BUHL, R.; STASSEN M.; TAUBE, C. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cells activation and prevents allergic airway. **Phytomedicine**, v. 19, p. 115-121, 2012.

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

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá**, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.*, 28(2):165-170 (2006);

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá**, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.*, 28(2):165-170 (2006);

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 10.ed. **Stuttgart: Deutscher Apotheker**, 1994;

Di Rosa P., Villaescusa J.C., Longobardi E., Iotti G., Ferretti E., Diaz V.M., 2007. **Homeodomain transcription factor Prep1 (pKnox1) is required for hematopoietic stem cells and progenitors activity**. *Dev. Biol.* 311, 324–334.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* V. 75, p 125-131, 1995

EDWARD, J. C.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A.; **The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous inject of air: an in vivo tissue culture system**. *J. Pathol.*, 134 (2): 147-56, 1981;

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

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.

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

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

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. **Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.** Revista Associação Médica Brasileira. Capturado em 13 jul. 2017. Online. [Links]Disponível na Internet: http://w.../scielo.php?Script=sci_arttext&pid=SO104-42302000000300012&lng=pt&nrm=is.

FILHO, R.F. & ZILBERSTEIN, B. **Óxido nítrico: O simples mensageiro percorrendo a complexidade.** Metabolismo, síntese e funções. Revista Ass. Méd. Brasil, v. 46 (3), p.265-271, 2000

FRANGOIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. **The inflammatory response in myocardial infarction.** Cardiovasc Res, v. 53, p. 31-47, 2002.

FRÖLICH, S; VIGO, A; MENGUE, S.S. **Association between the morisky medication adherence scale and medication complexity and patient prescription knowledge in primary health care.** Latin American Journal of Pharmacy. v.30, n.7, p.1348 -1354, 2011;

FUCHIKAMI, H.; SATOH, H.; TSUJIMOTO, M.; OHDO, S.; OHTANI, H.; SAWADA, Y. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 34, n. 4, p. 577-582, 2006.

GAIND; K.N.; GUPTA, R.L. Flavonoid glycosides from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 20, p. 368-373, 1971;

GONZÁLEZ, R. BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELA, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.331-362, 2011.

GREEN, C. A.; SHUSTER, S. **Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis.** British Journal of Clinical Pharmacology, v. 24, p. 381-384, 1987.

GREER, M. R. J.; CATES, R. G.; JOHNSON, F. B.; LAMNAOUER, D.; OHAI, L. Activity of acetone and methanol extracts from thirty-one medicinal plant species against herpes simplex virus types 1 and 2. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n.9, p.1031-1037, 2010.

GRISHAM, M.B.; GRANGER, D.N.; NEIL, D. & LEFER, D. J. **Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease.** Free Radical Biol. Med., v. 25, p. 404-433, 1998.

GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D. & WINK, D.A. **Physiological chemistry of nitric oxid and its metabolites: implications of inflammation.** American Physiological society, v. 0193, p. G315-G321, 1999.

- GUPTA, R.; LOHANI, M.; ARORA, S. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts/fractions of *Bryophyllum pinnatum* Saliv.Syn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n.1, p. 16-18, 2011.
- GUPTA, R.; LOHANI, M.; ARORA, S.; REHNI, A. K.; CHAUHAN, R. Anti-inflammatory activity of extracts and isolated alkaloidal fraction from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **Pharmacology online**, v. 2, p. 873- 886, 2010;
- HAGENBUCH, B.; GUI, C. **Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family**. **Xenobiotica**, v. 38, p. 778-801, 2008.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2nded. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p;
- 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, n.4, p. 201-205, 2007.
- KAMBOJ, A.; SALUJA, A. K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile : A review. **Pharmacognosy Review**, v.3, n. 6, p. 364-374, 2009.
- KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Microscopical and preliminary phytochemical studies on aerial part (leaves and stem) of *Bryophyllum pinnatum* kurz. **Pharmacognosy Journal**, v.2, n.9, p. 254-259, 2010.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins- Patologia Básica**. 8. ed, Rio de Janeiro: ELSEVIER. 2008.
- KWAK, H.S.; PARK, S.Y.; NGUYEN, T.T.; KIM, C.H.; LEE, J.M.; SUH, J.S.; WHANG, W.K.; SOHN, U.D. Protective effect of extract from *Rumex aquaticus* Herba on ethanol-induced gastric damage in rats. **Pharmacology**, v. 90, p. 288-297, 2012.
- LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. **Mediators of inflammation**. Annual Review of Immunology, v. 1, p. 335-359, 1983.
- LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. **Mediators of inflammation**. Annual Review of Immunology, v. 1, p. 335-359, 1983.
- LIMA, D. **Manual de farmacologia clínica: terapêutica e toxicologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1252, 1993;
- LIMA, K.V.B. **Estudo da atividade antiinflmatoria do extrato hidroalcoólico de *Cissampelos sympodialis* Eich (Menispermaceae) em diferentes modelos experimentais**. Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, p 14-32, 1999.
- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 2000;
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. 2^a ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, C. A.; VEIGA Jr. V. F.; GRYBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: a Necessidade de estudos Multidisciplinares. **QUIMICA NOVA**, v. 25, n. 3, p. 429- 438, 2002;

MAJAZ, Q.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; RAHIL, K.; SIRAJ, S.; Evaluation of antioxidant activity of *Kalanchoe pinnata*. **International Journal of Research in Ayurveda e Pharmacy**, v.2, n.6, p. 1772-1775, 2011;

MAJNO, G. & PALADE, G.E. Studies on inflammation. I. **The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study**. J. Biophys. Biochen. Cytol., v. 11, p. 571-605, 1961.

MARRIAGE, P. B.; WILSON, D. G. Analysis of the organic acids of *Bryophyllum calycinum*. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.49, n.3, p. 282-296, 1971.
Mclines

MCINNES, P.F. et al. Monitoring exposure of nestling songbirds to agricultural application of an organophosphorus insecticide using cholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.15, p.544-552, 1996.

MELO, M.G.D.; G. A. A. Dória; Serafini, M.R.; Araújo, A. A. S. **Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe**. Scientia Plena 8, 049903 (2012);

MONCADA S, PALMER RMJ, HiGGs EA (1991) **Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology**. Pharmacological Reviews 43, 104-142.

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

MORRIS, B. C. et al. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. Poultry Science, v. 83, n. 10, p. 1667-1674, 2004.

MORTON, J.F. Mucilaginous plants and their uses in medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 245-266, 1990.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZABRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with Gastroprotective activity. **Molecules**, 14, p. 979-1012, 2009.

MOTT, V. T. **Bioquímica clínica: métodos e interpretações**. 2 ed. São Paulo: Médica Missau, p. 354, 1989;

MUTHU, C.; AYYANAR, M.; RAJA, N., IGNACIMUTHU, S. **Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India**. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v. 7, n. 2, p. 43, 2006;

MUTHUIRULAPPAN, S.; RAJENDREN, S. Trend on tradicional system of medicine and modern Ethnopharmacology – Perspective view. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 7-11, 2013.

MUZITANO, M. F. **Flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (CRASSULACEAE): Avanços na pesquisa da utilização desta espécie medicinal no tratamento da leishmaniose cutânea.** Rio de Janeiro, 2006. 186 p. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006a.

MUZITANO, M. F.; BERGONZI, M. C.; MELO, G. O. D.; LAGE, C. L. S.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial 131 flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 132-137, 2011.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; ALMEIDA, A. P.; SILVA, S. A. G.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. **Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*.** *Planta Medica*, v.72, p. 81-83, 2006b.

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

NASSIS, C.Z. **Estudo da atividadehistaminica do suco extraído das folhas de *Bryophyllum calycycinum* Salisb. (Crassulaceae) e de uma das suas frações.** 1991. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo,USP, São Paulo, 1991.

NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** *Nature*, 420: 846-52, 2002.

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

NIEMEGEREERS,C.J.; VERBRUGGEN, F.J.; JANSSEN, P.A. Effect of various drugs on carrgeenan-induced o edema in the rat hind paw. **Journal of Pharmacy na Pharmacology**, v.16, p. 810-816, 1964.

NIRMALA, P.; RAMANATHAN, M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 75-79, 2011.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 13-19, 2005.

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

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 1456-1461, 2011a.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2011b.

PADMJA, S. & HUIE, R.E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; v 195, p. 539-544, 1993

PAL, S.; CHAUDHURI, N. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, p.97-102, 1991.

PEREZ, A. C.; CORREA, M.F.; BORGES, S.R. Anti-ulcer activity from the leaves of *Bryophyllum sp.* **Archives of Veterinary Science**, v.4, n.1, p.111-112, 1999;

PESSOA, B.F; LUCENA, de M.V.M. J, ALMEIDA, DE, O.F.M. **Estudo fitoquímico de extratos vegetais ativos contra *Enterococcus faecalis***. IN: CONGRESSO NACIONAL DE NORTE E NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 5, 2010, Alagoas. *Anais...* CONNEPI 2010: 978-85-64320-00-0;

PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, p. 238-288, 2005.

RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*. v. 39, p. 603-13, 2001;

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. **IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism**. *Immunology*. 73(4):472-7, 2000;

RICE-EVANS; C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7. p. 933-956, 1996.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicinal situations 2011: traditional medicines: global situations, issues and challenges**. 3 ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12 disponível em: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. Acesso em 25 de fevereiro de 2017 as 15:00 h;

ROTH, M.; ARAYA, J. J.; TIMMERMANN, B. N.; HAGENBUCH, B. Isolation of modulators of the liver-specific organic anion-transporting polypeptides (OATPs) 1B1 and 1B3 from *Rollinia emarginata* Schlecht (Annonaceae). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n.2, 2011.

SALAHDEEN, H. M.; YEMITAN, O. K. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. **African Journal of Biomedical Research**, v.9, n. 2, p. 101-107, 2006.

SANTOS, S. D. A.; MELLO, J. C. P. D. Taninos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da**

planta ao medicamento. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 615-656.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 371-402.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 711-740.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. **Initiation of inflammatory response and its prevention.** In: Handbook of inflammation. Eds. Bonta, I.L., Bray, M.A.; Parnham, M.J., p. 27-47, New York: Elsevier, 1985;

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SULTANA, N. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **Phytochemistry**, v.28, n.9, p.2433-2438, 1989.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios – Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão preto, SP: Tecmedd, 2004, 480p.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, F. B. **Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic pain in mice.** *Pain*, v. 152, p. 1872-1887, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 466-496.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 5.ed. ver.amp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2007; p.577-614

SMITH, G. **Kalanchoe species poisoning in pets.** *Veterinary Medicine*, p.933-936. 2004. Disponível em: <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/article/articleDetail.jsp?id=132513>>. Acesso em: 26 de junho de 2017;

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. **Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology.** *Ann Rev Biochem*, v. 69, p. 145-182, 2000.

SOARES, M. V.; CHACON, S. F.; NODA, S. N.; NODA, H.; MENDONÇA, M. A. F.; HIDALGO, A. F.; MENDONÇA, M. S. S.; SILVA, A. L.; RIBEIRO, W. G.; BRAGA, M. D. S.; **Sistema de produção e conservação tradicional das plantas medicinais por agricultores familiares nas localidades de nova aliança e novo.** paraíso no município de

Benjamin Constant-AM. Disponível em<
http://www.cnpat.embrapa.br/sbsp/anais/Trab_Format_PDF/179.pdf> acessada em 13 de julho de 2017.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de Ôtoterápicos**. In: SIMÕES, C.M.O et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. p.290-326;

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma visão da bioatividade e potenciais benéficos nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T. R.; EVANS, T. G. **Down- regulation of nitric oxide biosynthesis by cyclic nucleolides**. IN: MONCA- DA, S., MARLETTA, M. A., HIBBS, J. B. Jr., HIGGS, E. A. *Biology of nitric oxide*: 2. London: Portland Press, 1992.
STEVENS, A. & LOWE, J. *Patologia*. 2ª ed. 1998.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSH, K. M. **Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate**. *Skin Pharmacology*, v. 4, p. 262-271, 1991.

SARKER, SATYAJIT D. *Química para estudantes de farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais*. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

STRAYER, L. *Bioquímica*. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000 p., 1996;
SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 947-949, 2001.

PADMJA, S. & HUIE, R. E. **The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; v 195, p. 539-544, 1993.

TABARELLI, M., Silva, J.M.C. 2002. Introdução. In: Tabarelli, M. e Silva, J.M.C. (eds.) **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. Ed. Massangana, Recife. pp. 9-12 ;

TAO, X.; MA, L. & LIPSKY, P. E. **Suppression of carrageenan-induced inflammation in vivo by extract of Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F**. *Inflam. Res.*, 48: 139-148. 1999;

TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BioMed Central Research Notes**, v. 5 p. 158, 2012.

VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C.; CALIXTO, J. B.; ZUMINO, L.; PATUTUCCI, M. L.; **Phytother. Res.** 2002, 15, 476;

VIEIRA, I.C.G; SILVA, J.M.C; TOLEDO, P.M. 2005. **Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia**. Estudos Avançados 19 (54): 153–164.

VINEGAR, R., TRAUJ J.F, SELPH J.L. Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, p.711-714, 1973.

WHO. **Quality control methods for medicinal plants materials**. Geneva: WHO, 1992.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. **Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system**. Life Sciences, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLOUGHBY, D. A. **In vivo models of Inflammation**. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. Inflammation protocols, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. **The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide**. Free Radic. Biol. Med., v. 25, p.434-456, 1998.

WINK, D.A.; COOK, J.A.; KIM, S.; VODOVOTZ, Y.; PACELLI, R.; KIRSHNA, M.C.; RUSSO, A.; MITCHELL, J.B.; JOURD'HEUIL, D.; MILES, A.M. & GRISHAM, M.B. **Superoxide mediates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates**. J. Biol. Chem., v.272, p.11147,11151, 1997.

YAMAGISHI, T.; HARUNA, M.; YAN, X.Z.; CHANG, J.J.; LEE, K. H. **Antitumor agents, 110**, Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. Journal of Natural Products, v. 52, n. 5, 1071-1079, 1989.

YEMITAN, O. K.; SALAHDEEN, H. M. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 187-193, 2005.