



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ELIAS FLÁVIO QUINTINO DE ARAÚJO

Aplicação de planejamentos estatísticos para a extração dos compostos fenólicos obtidos a partir das folhas de aranto (*Kalanchoe crenata*) e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano

RECIFE – PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ELIAS FLÁVIO QUINTINO DE ARAÚJO

Aplicação de planejamentos estatísticos para a extração dos compostos fenólicos obtidos a partir das folhas de arauto (*Kalanchoe crenata*) e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Gregório Vieira Aquino

RECIFE – PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A663a Araújo, Elias Flávio Quintino de Araújo
Aplicação de planejamentos estatísticos para a extração dos compostos fenólicos obtidos a partir das folhas de aranto (*Kalanchoe crenata*) e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano. / Elias Flávio Quintino de Araújo Araújo. - 2023.
50 f. : il.
- Orientadora: Keila Aparecida .
Coorientadora: Pedro Gregorio Vieira .
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Garanhuns, 2023.
1. Produtos naturais vegetais . 2. Bactérias Gram-positivas . 3. Bactérias Gram-negativas. 4. *Kalanchoe* sp. I. , Keila Aparecida, orient. II. , Pedro Gregorio Vieira, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ELIAS FLÁVIO QUINTINO DE ARAÚJO

Aplicação de planejamentos estatísticos para a extração dos compostos fenólicos obtidos a partir das folhas de aranto (*Kalanchoe crenata*) e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano

Dissertação apresentada e aprovada em 24 de fevereiro de 2023 pela comissão examinadora:

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Orientadora/Presidente)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Profa. Dra. Rosângela Estevão Alves Falcão (Membro Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior (Membro Externo)
Universidade Federal de Alagoas

Dr. José Erick Galindo Gomes (Membro Externo)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

RECIFE – PE

2023

Aos meus pais, **Celia Maria de Araújo Souza e Elias Quintino de Souza**, por serem exemplos e modelos de conduta, pelo amor incondicional, respeito e que não mediram esforços para que esta conquista se tornasse real.

Aos meus irmãos, Fabiana Quintino de Araújo Patriota e Felipe Quintino de Araújo, por serem incentivadores, por me apoiar, por acreditar em meus sonhos e por lutar grandes batalhas comigo.

Decido.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela inspiração e iluminação em todos os momentos durante essa árdua jornada.

Em especial, agradeço: Aos meus pais, por toda força, carinho, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Keila Moreira e Prof. Dr. Pedro Aquino, pela paciência e dedicação durante o transcurso da pesquisa.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. José Erick Gomes, Profa. Dra. Rosângela Falcão e Prof. Dr. Edeildo Júnior, pelas valiosas contribuições.

Aos colegas da turma do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Maria Tamires Espindola, Bruna Soares, Mauricio Costa, Edson Teixeira, Gleidson Lima e Anna Cavalcante.

Aos meus amigos, em especial, Wellington Leal e Bruno Gomes, por todo o incentivo e dedicação.

A Universidade Federal do Agreste de Pernambuco e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela infraestrutura física e pela minha formação intelectual.

Ao Programa de Pós-Graduação Biociência Animal, especialmente aos coordenadores e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A Prefeitura Municipal de Jupi pelo apoio e incentivo durante a realização dessa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse construído.

*“Temos o direito de ser iguais quando a nossa
diferença nos inferioriza; e temos o direito de ser
diferentes quando a nossa igualdade nos
descaracteriza”*

Bouventura de Souza Santos

RESUMO

O gênero *Kalanchoe* abrange diversas espécies que vêm sendo empregadas no tratamento de diversas doenças. Esse vegetal apresenta constituintes químicos diversos, dentre os quais os flavonoides e compostos fenólicos, como terpenos e cumarinas que apresentam potencial antioxidante e antimicrobiano. Dessa forma, objetivou-se otimizar o processo de extração de compostos fenólicos do aranto (*Kalanchoe crenata*), empregando-se planejamentos estatísticos e a avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos. Empregou-se um planejamento fatorial 2^4 com variação no tempo de sonicação, pH inicial, concentração de aranto, e proporção água:álcool para avaliar o efeito dessas variáveis sobre a extração de compostos fenólicos. Assim, as variáveis tempo de sonicação e concentração de aranto que apresentaram efeito significativo na extração de compostos bioativos foram empregadas no processo de otimização. Os extratos obtidos foram submetidos à determinação de compostos fenólicos e potencial antioxidante frente aos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e quelação de Cu²⁺ e Fe²⁺. Os teores de compostos fenólicos obtidos variaram entre 55 a 460 mg de EAG/mg de extrato bruto, com um aumento significativo após a otimização, mantendo-se entre 538,33 e 1473,89 mg de EAG.mg⁻¹. Após análise do planejamento fatorial 2^4 constatou-se que as variáveis tempo de sonicação e concentração de aranto foram significativas para a extração de compostos fenólicos. Além disso, os extratos obtidos apresentaram potencial antioxidante frente ao sequestro de radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e quelante de Cu²⁺ e Fe²⁺. Com relação ao potencial antimicrobiano, o extrato apresentou maior potencial de inibição (%), utilizando a concentração 2 mg.mL⁻¹ frente à *Escherichia coli*, já frente as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* observou-se maior potencial inibitório na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Além disso, o extrato bruto estudado foi capaz de inibir o crescimento de *Candida tropicalis* e de *Candida fomata*. Dessa forma, os extratos de *Kalanchoe crenata* apresentaram potencial antioxidante e antimicrobiano, o que pode indicar possível aplicação em alimentos e formulações farmacêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais vegetais. Bactérias Gram-positivas. Bactérias Gram-negativas. *Kalanchoe* sp.

ABSTRACT

Different *Kalanchoe* species are used as medicinal plants in different cultures, containing various phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids with antioxidant potential. Therefore, the aim was to optimize the extraction process of phenolic compounds from cranberry (*Kalanchoe crenata*) using a central substance scheduling system and to evaluate the antioxidant and antibacterial potential of the extracts obtained. A 2^4 factorial design with variations in sonication time, initial pH, cranberry concentration, and water:alcohol ratio was used for variable selection. Thus, the variables that have a significant effect on the extraction of phenolic compounds were included in the optimization. The obtained extracts were used to determine the phenolic compounds and antioxidant potential against DPPH \cdot and ABTS $^{2+}$ radicals, as well as chelation with Cu $^{2+}$ and Fe $^{2+}$. The phenolic compound contents obtained ranged from 55 to 460 mg gallic acid equivalents/mg crude extract, with a significant increase after optimization, ranging from 538.33 to 1473.89 mg.EAG.mg $^{-1}$. After the factorial design 2^4 analysis, it was found that the variables sonication time and concentration of aranto were significant for the extraction of phenolic compounds. Moreover, the extracts obtained showed antioxidant potential against DPPH \cdot and ABTS $^{2+}$ radicals and chelation with Cu $^{2+}$ and Fe $^{2+}$, which increased after optimization. Regarding antibacterial potential, the extract showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2 mg.mL $^{-1}$ against *E. coli*, and against *S. typhimurium* and *S. aureus* bacteria, the MIC was 1 mg.mL $^{-1}$. The crude extract studied inhibited the growth of *Candida tropicalis* and *Candida fomata*. Finally, the extracts of *Kalanchoe crenata* showed significant antioxidant and antibacterial potential, which could indicate a possible application in food and pharmaceutical formulations.

KEY WORDS: Natural plant products. Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria. *Kalanchoe* sp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Fitoterapia.....	10
2.2. Aranto (<i>Kalanchoe crenata</i>).....	12
2.3. Fatores que influenciam na extração de compostos fenólicos	16
2.4. Atividade antioxidante	17
2.5. Atividade antimicrobiana	19
REFERÊNCIAS	20
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
CAPÍTULO 1	27
2.1. Preparo do material vegetal, delineamento experimental e processo de extração	31
2.2. Delineamento experimental e processo de extração.....	31
2.3. Otimização empregando Metodologia de Superfície Resposta para extração de compostos fenólicos.....	31
2.4. Determinação do conteúdo fenólico total	32
2.5. Determinação de flavonoides totais.....	33
2.6. Avaliação do potencial antioxidante	33
2.6.1. Ensaio de eliminação do radical DPPH*.....	33
2.6.2. Ensaio de eliminação do radical ABTS ⁺	34
2.6.3. Atividade de quelação de Fe ²⁺	34
2.6.4. Atividade de quelação de Cu ²⁺	35
2.7. Atividade antimicrobiana	35
2.8. Análise estatística.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

1. INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre as plantas medicinais, assim como o seu uso em forma de medicamento, têm acompanhado a humanidade ao longo do tempo. Essa abordagem ganhou espaço no mercado nos últimos anos, que havia sido dominado por fármacos sintéticos (CALIXTO, 2019). Muitas espécies vegetais possuem propriedades terapêuticas e, portanto, o uso destas representa um fator essencial para a manutenção das condições de saúde das pessoas (SSENKU *et al.*, 2022).

O gênero *Kalanchoe* (Crassulaceae) compreende espécies ornamentais e medicinais, as quais têm sido usadas no tratamento de doenças infecciosas, ferimentos e enfartamentos ganglionares. Dentre os principais constituintes químicos no gênero estão os flavonoides e muitos outros compostos fenólicos, tais como terpenos e cumarinas (LOBATO *et al.*, 2019; VARGAS *et al.*, 2022). Esses compostos conseguem, por exemplo, parar a proliferação, disseminação e renovação automática de células tumorais (TIRUMALA *et al.*, 2022).

Do ponto de vista medicinal, diferentes espécies de *Kalanchoe*, como *K. pinnata* e *K. daigremontiana* apresentaram diversas atividades, dentre elas, antitumoral, anti-histamínica, anti-inflamatória e imunomoduladora (FERNANDES *et al.*, 2019). Além disso, a ação antiulcerogênica e gastroprotetiva foi discutida no estudo desenvolvidos por De Araújo *et al.* (2018). Autores discutem também que o extrato de suas folhas apresenta ações antifúngica, bactericida, analgésica e anti-inflamatória (DOGRA *et al.*, 2022; HAMILTON-AMACHREE; UZOEKWE, 2022)

A espécie *K. daigremontiana* é usada na medicina tradicional contra várias infecções, como anti-inflamatório e no tratamento de vários tipos de câncer, além disso, são usadas para tratar lesões e doenças relacionadas a danos celulares, como câncer, feridas profundas, gangrena, infecções, queimaduras, tumores e inflamação principalmente entre populações nativas africanas e brasileiras (SILVA *et al.*, 2022).

No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade vegetal que se deve a variabilidades genética e bioquímica, além da ecologia do local onde a planta é produzida (UNUOFIN; LEBELO, 2020). Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies.

Portanto, avaliar diferentes condições de extração e determinar o potencial antioxidante, antibacteriano e antifúngico dos compostos extraídos é de extrema importância, devido à crescente popularidade e uso de espécies de *Kalanchoe* que ainda são pouco conhecidas em relação a diferentes atividades e potencialidades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fitoterapia

O uso de produtos medicinais à base de plantas (fitoterápicos) é uma prática milenar que vem sendo utilizada por civilizações desde o início da história para a prevenção, cura e/ou tratamento de diversas doenças. No século XXI, mesmo com uma grande diversidade de medicamentos alopáticos, a fitoterapia continua sendo utilizada amplamente em todo o mundo (YUAN *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, o interesse pelas plantas medicinais tem crescido significativamente, sendo cada vez mais empregado em serviços de saúde, bem como, em diversos setores industriais (NAJMI *et al.*, 2022). Além disso, nos últimos 100 anos o progresso técnico-científico, especificamente, na área da farmacognosia, permitiu a descoberta de um grande número de novas moléculas e seus mecanismos de ação associados a fitofármacos (PRAKOFJEWÁ *et al.*, 2022).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está arraigada às culturas indígena, africana e dos imigrantes europeus (PASA *et al.*, 2019). A grande biodiversidade nacional é a maior do planeta, e está associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, e possui o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas voltadas para áreas tecnológicas e terapêuticas (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; BRAGA, 2021).

Por serem de origem natural, são mais seguras e causam menos efeitos tóxicos, contribuem para isso o uso de fitoterápicos ganha destaque no Brasil (PALHARES *et al.*, 2021), sobretudo, após a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF, regulamentada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, justifica-se pela presença da ciência fitoterápica no cotidiano das pessoas (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

De acordo com Nailwal, Venkatahiva e Gupta (2021), o fácil acesso às plantas medicinais e a produção de preparações fitoterápicas artesanais em áreas rurais justificam a adesão da fitoterapia muitas vezes como a principal alternativa para a prevenção e tratamento de doenças, principalmente as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Nas áreas urbanas a adesão pela fitoterapia admite-se também por questões culturais, facilidade de acesso, e por ser um tratamento alternativo à alopatia. Comparando com medicamentos sintéticos ou semissintéticos, os fitoterápicos, têm um menor valor de produção, sendo este dependente dos processos utilizados e, conseqüentemente da comercialização (KARIMI; MAJLESI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2015).

De forma geral, o acesso aos medicamentos é limitado por questões econômicas, o que leva as pessoas a buscarem tratamentos mais baratos ou gratuitos, como é o caso da utilização de plantas medicinais retiradas diretamente da natureza. Além disso, existe grande disposição da população brasileira para utilizar produtos medicinais de origem vegetal (STEFANELLO *et al.*, 2018). O aumento do uso de medicamentos baseados em plantas medicinais tem refletido no aumento do interesse dos médicos e outros profissionais da saúde na prescrição destes (SILVA; GUEDES, 2022).

Segundo Falcão *et al.* (2022), o conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribui de forma relevante para a divulgação dos potenciais terapêuticos das espécies e desperta o interesse de pesquisadores das áreas da botânica, farmacologia e fitoquímica, enriquecendo com isso o conhecimento e intensificando o uso das mesmas. A eficácia e a segurança, quanto ao uso de muitas plantas medicinais, já foram comprovadas cientificamente, o que permitiu admitir seus usos como recursos terapêuticos benéficos e indispensáveis à humanidade (PRASATHKUMAR *et al.*, 2021).

O conhecimento popular a respeito dos produtos fitoterápicos não é o bastante para assegurar seu uso e eficácia. Diante disso, é importante se ter cuidado com o uso indiscriminado e em altas quantidades. Estudos farmacodinâmicos e toxicológicos são necessários para garantir os benefícios e segurança do uso (MENSAH *et al.*, 2019). A pesquisa científica moderna confirmou a importância dos compostos fenólicos e flavonoides e da capacidade de extratos vegetais para trabalhar em sinergia com os componentes, com foco na melhoria da eficácia e segurança de seu uso no atendimento ao paciente. Em paralelo, o controle de qualidade da produção

levou a padronização na produção dos padronizados, além disso, a descoberta de novas moléculas permitiu um amplo repertório de medicamentos baseados em plantas medicinais que ainda se encontra em expansão (MACEDO, 2019).

Ao longo da história da farmacologia e da medicina, os pesquisadores isolaram compostos obtidos de espécies vegetais de valor medicinal para a síntese de centenas de substâncias ativas. Isto ocorreu com base no conhecimento empírico popular e daqueles resgatados nas comunidades tradicionais. Desta forma, foi possível reunir um volume de conhecimento para a produção de grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado (STEFANELLO *et al.*, 2018).

As plantas medicinais são consideradas por grande parte da população como um produto natural, com boa ação farmacológica, livre de qualquer reação que possa causar efeito maléfico, o que contribui para os altos índices de sua utilização. Todavia, apesar de passarem a ser vistas como sinônimos de segurança e benefício à saúde, é importante ressaltar que, muitas delas comumente utilizadas, apresentam substâncias capazes de exercer ação tóxica (ATANASAC *et al.*, 2021). Componentes fitoterápicos individuais possuem um amplo conjunto de constituintes químicos (WANG *et al.*, 2022), sendo, portanto, indispensável conhecer muito bem as plantas que se pretende utilizar, assim como os efeitos adversos que possam causar (EKOR, 2014)

O mercado anual global de medicamentos fatura cerca de 1,1 trilhão de dólares americanos. Cerca de 35% desses medicamentos são originados direta ou indiretamente de produtos naturais, incluindo plantas (25%), microrganismos (13%) e animais (3%), o que constituem um importante recurso para produtos farmacêuticos (CALIXTO, 2019; NEWMAN; CRAGG, 2020).

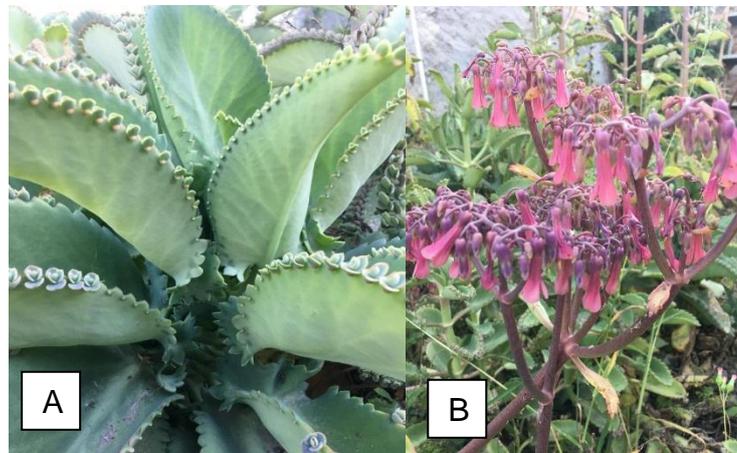
Os estudos relacionados à fitoterapia são extremamente necessários para preencher lacunas frente ao uso correto de plantas medicinais, que está atrelado ao conhecimento popular sem evidências científicas quanto à segurança e eficácia das mesmas.

2.2. Aranto (*Kalanchoe crenata*)

A espécie *Kalanchoe crenata* é uma planta ornamental, herbácea carnuda, que pertence à família das Crassulaceae, também conhecida como *Bryophyllum* (Tabela 1). Apresenta folhas decussadas, suculentas e glabras; oval a lâminas foliares

elípticas; e margens crenadas (FERNANDES *et al.*, 2019). As folhas dessa planta são as mais utilizadas na medicina popular e nos estudos de atividade biológica (Figura 1), sendo altamente suscetíveis as variações do ambiente, principalmente à intensidade da luz. Observa-se que, quando essas são desenvolvidas sob luz alta, são geralmente menores e mais espessas, frequentemente apresentam uma densidade de estômatos maior na epiderme e cutícula, e mesofilo mais desenvolvido, quando comparadas às plantas desenvolvidas à pouca luz (MOREIRA *et al.*, 2012).

Figura 1. Folhas (A) e flores (B) de *Kalanchoe crenata*.



Fonte: Autor (2022).

Esta espécie é uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC), amplamente utilizada na África para o tratamento de doenças inflamatórias. Segundo informações de curandeiros tradicionais da Província do Oeste localizada em Camarões, essa hortaliça é eficiente no tratamento do diabetes *mellitus* (WANG *et al.*, 2022). Kamgang *et al.* (2005), observaram os efeitos diabetogênicos bem como, intolerância à glicose, obesidade e dislipidemia associada à uma hiperglicemia leve em ratos Wistar.

Dentre os principais constituintes químicos do gênero estão os flavonoides que apresentam potencial biológico contra o estresse oxidativo, prevenção e mitigação de doenças crônicas não transmissíveis. Além disso, vem sendo usados para o tratamento de câncer, devido a capacidade de impedir a proliferação, disseminação e renovação automática de células cancerígenas (RASHID *et al.*, 2019; ULLAH *et al.*, 2020).

Tabela 1. Características botânicas de *Kalanchoe crenata*.

Características	<i>Kalanchoe crenata</i>
Altura da planta	60 cm
Textura das superfícies	Glabo (às vezes puberal, e geralmente mais alto nas plantas, com pelos finos e espalhados).
Forma de sépala	Linear-lanceolada a linear
Tipo de vegetação	Floresta úmida
Suculência da folha	Alta
Cor da flor	Laranja brilhante, amarela e vermelha
Caule	Circular que carrega folhas
Raízes	Ligeiramente suculentas
Habitat	Terrestre, em troncos em decomposição, ocasionalmente epífita ou litofítica, sombra total.

Fonte: Adaptada de Kamgang *et al.* (2005).

Há relatos de pessoas que vivem nas áreas rurais do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, que utilizam as folhas do "coirama", nome popular dado a espécie de *Kalanchoe*, diretamente nas feridas como cura e para tratar úlceras e gastrite (RODRIGUES *et al.*, 2018). Até o momento, não há registro fitoterápico no Brasil que contenha o extrato do gênero *Kalanchoe* como ingrediente ativo (ARAUJO *et al.*, 2021).

Do ponto de vista medicinal, diferentes espécies de *Kalanchoe*, como *K. pinnata* e *K. daigremontiana* apresentaram diversas atividades, tais como antitumoral, anti-histamínico, anti-inflamatório e imunomodulador (FERNANDES *et al.*, 2021).

A *Kalanchoe* é um exemplo de planta que é utilizada em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, principalmente com ação antiulcerogênica (SOBREIRA *et al.*, 2022). Além disso, o extrato de suas folhas revelou ações antifúngica, bactericida, analgésica e anti-inflamatória (FERREIRA *et al.*, 2021, MEHATA *et al.*, 2021; TAJUDIN; ISMAIL, 2022).

A espécie *Kalanchoe crenata* Andr., comumente conhecida como "*nunca morra*" ou "*fígado de cachorro*", tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de doenças como, dor de ouvido, varíola, dor de cabeça, inflamação, asma, palpitações e convulsões. Os extratos aquosos e alcoólicos das folhas de *K. crenata* contêm alcaloides e saponinas (CHHETRY *et al.*, 2022). A planta tem vários produtos

benéficos para a saúde, como espasmolítico, anti-inflamatório, analgésico, anticonvulsivante, cardiovascular, atividade antimicrobiana, antioxidante e antinefropática (ZAMYAD *et al.*, 2019).

Na África Oriental, as folhas levemente aquecidas no fogo são esfregadas sobre o corpo como tratamento para rigidez articular e reumatismo (GILL, 1992). Outras partes da planta, especialmente a raiz, são prescritas para gonorreia, vermífugo e indução do aborto (AYE *et al.*, 2019). Os alcaloides e saponinas estão presentes nos extratos aquosos e alcoólicos das folhas, e as lectinas no suco das folhas frescas (AKINSULIRE *et al.*, 2007).

O interesse pela busca e utilização de compostos bioativos, em particular daqueles usados para fins terapêuticos, constam de relatos importantes entre as civilizações antigas, como a egípcia, a greco-romana e a chinesa (SANTOS; REIS, 2021).

As plantas medicinais apresentam diversidades de compostos capazes de promover benefícios em diversas áreas e usos pela humanidade. Sua ação terapêutica permite a atuação na medicina, farmácia e agricultura. Porém, a composição e concentração desses compostos na planta são variáveis e os fatores que favorecem sua síntese ocorrem a partir de múltiplas influências, como variáveis climáticas, estação do ano, composição nutricional do solo, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2017).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2022), as PANCs, caracterizadas como vegetais não consumidos pela sociedade em geral e/ou pela pobre exploração por parte da comunidade científica, demandam o desenvolvimento de estudos em relação a comprovação da bioatividade presente nos seus compostos. Somando a isso, o ser humano precisa de uma alimentação mais natural e saudável, pela diminuição ou exclusão de aditivos sintéticos e pela presença considerável de componentes funcionais, o que garante o bom funcionamento do organismo, melhoria da saúde dos consumidores e prevenção de doenças (KUMAR *et al.*, 2021).

Existe uma série de metabólitos secundários que são produzidos pelos vegetais superiores, responsáveis pela defesa natural da planta contra estresse biótico e abiótico. No grupo de metabólitos, estão envolvidos compostos nitrogenados, alcaloides, aminas, aminoácidos, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, inibidores de proteases e lectinas e não nitrogenados como os terpenoides, saponinas,

flavonoides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas e poliacetilenos (EL-READI *et al.*, 2021)

De acordo com Lyons *et al.* (2020), o potencial farmacológico de diversas plantas está associado à presença de macro e micronutrientes em alguns vegetais. Os compostos químicos que exercem uma alta atividade biológica, os quais são chamados de compostos bioativos, podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (JAIME; SANTOYO, 2021).

Os compostos fitoquímicos são provenientes dos metabolismos primário e secundário dos vegetais e geralmente estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou outros patógenos (DESMEDT *et al.*, 2020; SETYOTINI; ANTARLINA, 2022). Estes compostos, dentre os quais, flavonoides, compostos fenólicos como terpenos, cumarinas entre outros, possuem como função fisiológica a ação contra radicais livres, ação anti-inflamatória, antidiabética, antibacteriana, antifúngica e antiviral e, deste modo, conseguem proteger o organismo contra o estresse oxidativo, o que evita e previne uma série de distúrbios crônico-degenerativos. Em virtude da sua potencialidade farmacológica, os compostos fenólicos são substâncias naturais com atividade biológica (FERREIRA; MARTINS; BARROS, 2017; CVETANOVIĆ *et al.*, 2018).

2.3. Fatores que influenciam na extração de compostos fenólicos

Diversos fatores podem influenciar a extração de compostos fenólicos, dentre eles, podemos ser a concentração do material vegetal, tempo de sonicação, pH, relação solvente:vegetal, temperatura, dentre outros (DA SILVA *et al.*, 2022).

Em relação aos solventes hidroalcológicos, estudos apontam que uma relação entre 0% a 50% de etanol é a melhor para extração de compostos fenólicos e flavonoides (SAS, 2019). Outro aspecto relevante da extração de compostos fenólicos é a seleção de um pH adequado que pode influenciar na estabilidade dos compostos fenólicos. Condições ácidas estão associadas a maiores rendimentos de extração (maior interação dos compostos fenólicos com o solvente) em diferentes fontes vegetais de compostos fenólicos, no entanto, não há estudos que comprovem que tais

condições se adéquam a extração desses compostos utilizando espécies de *Kalanchoe* (ROSELLÓ-SOTO *et al.*, 2019).

Segundo Tsao (2010), para extração de polifenóis utiliza-se pH baixo, pois em ambientes ácidos esses compostos adotam a forma neutra, que é a mais adequada para ser solubilizada. No entanto, a acidificação excessiva pode prejudicar a extração, uma vez que o perfil dos polifenóis nativos pode ser distorcido devido à hidrólise de (acil)glicosídeos simples.

Nesse sentido, Gandolpho *et al.* (2019), demonstram a necessidade de buscar estudos que demonstrem a compreensão da relação entre variáveis independentes, tais como proporção de solvente, concentração de soluto e a cavitação gerada pelas ondas ultrassônicas, frente a extração de compostos fenólicos de *Kalanchoe* spp.

O uso de banho ultrassônico exerce papel importante na extração de diversos compostos bioativos, dentre os quais, polifenóis, fenólicos e flavonoides. Essa técnica consiste na utilização de ondas mecânicas induzidas pela explosão de microbolhas que gera uma rápida desorganização no tecido vegetal, facilitando a passagem dos fitoquímicos de onde está mais concentrado para o solvente que se encontra com uma menor concentração dos metabólitos vegetais (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Para Shirzad *et al.* (2017), trata-se de um método economicamente viável e relativamente simples, além disso, pode ser usado em ambientes com tamanhos variados. Nesse tipo de extração é necessária a utilização do ultrassom, também denominado por disruptor de células, com faixa de frequência entre 20 e 2000 kHz, aumentando a permeabilidade da parede celular e produzindo a cavitação. Ademais, o uso do banho ultrassônico provoca menos degradação nos compostos quando comparada a outras técnicas de extração, tais como a decocção (LIAO *et al.*, 2022).

2.4. Atividade antioxidante

A partir da década de 1980, as pesquisas com antioxidantes obtidos de fontes naturais foram amplamente intensificadas, bem como, a busca por aplicações em produtos alimentícios e de uso farmacêutico, tendo como meta a substituição total ou

parcial de antioxidantes sintéticos, os quais têm uso limitado, considerando-se o seu potencial carcinogênico, dentre outras doenças (UZOMBAH, 2022).

O interesse em antioxidantes, substâncias capazes de impedir a oxidação sequestrando os radicais livres, naturais, especialmente os de origem vegetal, tem aumentado, pois a presença de radicais livres e estresse oxidativo pode estar associado ao desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e processos inflamatórios (PIZZINO *et al.*, 2017). O estresse oxidativo também é um problema para a indústria de alimentos, modificando as propriedades organolépticas e o valor nutricional dos mesmos (TAN; NORHAIZAN; LIEW, 2018).

Os antioxidantes naturais provenientes do extrato de plantas são preferíveis por sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos (PONNAMPALAM *et al.*, 2022) sendo ainda associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (LEITE *et al.*, 2012), visto a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, além da complexidade quanto ao modo de combate a substâncias radicalares (FABRI *et al.*, 2022). De acordo com Ralte *et al.* (2022), o potencial antioxidante presente em plantas medicinais pode dar origem à escolha de possíveis candidatos a estudos farmacológicos vinculados a esta propriedade bioquímica, sobretudo, devido a facilidade de cultivo e obtenção dos extratos vegetais.

A busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos vem crescendo ao longo dos anos, no entanto, continua um importante desafio para a pesquisa industrial (HOANG; MOON; LEE, 2021)

Segundo Di Meo e Venditti (2020), a atividade antioxidante tem sido associada aos compostos fenólicos vegetais, apontando que nas últimas décadas, as substâncias radicalares promoveram uma revolução na compreensão das perturbações que ocorrem nas células. No decorrer da atividade metabólica normal há formação desses radicais, existindo algumas células especializadas na sua produção; os radicais oxigenados desempenham um papel importante nas reações inflamatórias, na carcinogênese, na aterosclerose, nas lesões do trato gastrointestinal e no envelhecimento. A compreensão destes mecanismos e a descoberta de substâncias que os possam regular constitui uma via promissora na terapia das fisiopatologias associadas ao estresse oxidativo e ao processo de envelhecimento.

2.5. Atividade antimicrobiana

O uso intensivo de antibióticos tem levado ao aumento da resistência dos microrganismos causadores das doenças, por outro lado, existe a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos, sobretudo de origem natural (UDDIN *et al.*, 2021).

A medicina popular se tornou base para linhas de estudo sobre plantas medicinais, graças a terapêutica transmitida pelo conhecimento empírico. Os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todo os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os antimicrobianos e antitumorais, esta porcentagem pode chegar até 70% (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Devido à resistência de patógenos aos antimicrobianos, é necessária a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções. Drogas constituídas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina popular podem ser fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (CHE SULAIMAN *et al.*, 2017). Estas substâncias também podem agir sinergicamente com outras melhorando o potencial antibiótico (CHASSAGNE *et al.*, 2021).

O grupo químico dos flavonoides tem, entre outras atividades estudadas, a atividade antibacteriana, que está provavelmente relacionada à capacidade desse grupo de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede de células bacterianas rompendo-as. Já o potencial antifúngico está associado ao dos isoflavonoides (GÓRNIAK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019).

Segundo Ojo (2022), os taninos são compostos que possuem a habilidade de formar complexos com proteínas que são insolúveis em água. O efeito antimicrobiano dos compostos pertencentes a este grupo foi reportado por Hong *et al.* (2022), que acreditam que esta atividade é devido à inibição de enzimas de bactérias e fungos, à ação direta na membrana dos microrganismos ou pela competição pelos íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano.

Vale ressaltar que, a espécie *Kalanchoe crenata* é uma planta que possui muitas propriedades medicinais, das quais pode ajudar a tratar diversas enfermidades, como infecções e até o câncer. Portanto, esse estudo se faz necessário, pois ainda são escassas as pesquisas de prospecção de compostos bioativos derivados de aranto (*Kalanchoe crenata*). Neste contexto, torna-se

imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies.

REFERÊNCIAS

- AKINSULIRE, Odunayo. *et al.* 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.
- ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ATANASOV, Atanas. *et al.* Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- AYE, Mya Mu *et al.* A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.
- BRAGA, Fernão Castro. Paving new roads towards biodiversity-based drug development in Brazil: Lessons from the past and future perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1-14, 2021.
- BUDREVICIUTE, Aida *et al.* Management and prevention strategies for non-communicable diseases (NCDs) and their risk factors. **Frontiers in Public Health**, p. 788, 2020.
- CALIXTO, João. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CHASSAGNE, Francois *et al.* A systematic review of plants with antibacterial activities: A taxonomic and phylogenetic perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 2069, 2021.
- CHE SULAIMAN, Intan Soraya *et al.* Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2017.
- CHHETRY, Alisha Karki *et al.* Study of antibacterial activity of root bark, leaves, and pericarp extracts of *Diploknema butyracea* and evaluation of prospective antioxidant activity. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, 2022.
- CVETANOVIĆ, Aleksandra *et al.* Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 458-466, 2018.
- DA SILVA, Natallya Marques *et al.* Avaliação de diferentes solventes combinados a técnica de alta pressão para extração de compostos fenólicos totais e atividade

antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e43211629163-e43211629163, 2022.

DE ARAÚJO, Edilane Rodrigues Dantas *et al.* Gastroprotective and antioxidant activity of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf juices against indomethacin and ethanol-induced gastric lesions in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1265, 2018.

DE ARAÚJO, Edilane Rodrigues Dantas *et al.* Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, p. 108721, 2019.

DESMEDT, Willem *et al.* A phytochemical perspective on plant defense against nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 602079, 2020.

DI MEO, Sergio; VENDITTI, Paola. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

DOGRA, P. *et al.* *Kalanchoe pinnata* is a miraculous plant: A review. **Journal of Biomedical and Allied Research**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2022.

EKOR, Martins. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.

EL-READI, Mahmoud Zaki *et al.* Multiple molecular mechanisms to overcome multidrug resistance in cancer by natural secondary metabolites. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 658513, 2021.

FABRI, Rodrigo Luiz *et al.* Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de espécies de Arecaceae. **HU Revista**, v. 48, p. 1-16, 2022.

FALCÃO, Laura Trombini *et al.* *Endopleura uchi*: um breve resumo sobre suas propriedades farmacológicas e a importância das plantas medicinais para a sociedade contemporânea. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 3, n. 11, p. e3112142-e3112142, 2022.

FERNANDES, Júlia M. *et al.* *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 4, p. 529-558, 2019.

FERNANDES, Julia Morais *et al.* Detection, isolation, and ¹H NMR quantitation of the nitrile glycoside sarmentosin from a *Bryophyllum pinnatum* hydro-ethanolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 29, p. 8081-8089, 2021.

FERREIRA, Deuzilene da Silva *et al.* Caracterização química de uma cianidina glicosilada obtida a partir dos extratos de *Kalanchoe laetivirens* e avaliação do seu potencial antimicrobiano. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e345101421483-e345101421483, 2021

FERREIRA, Isabel; MARTINS, Natália; BARROS, Lillian. Phenolic compounds and its bioavailability: In vitro bioactive compounds or health promoters? In: **Advances in food and nutrition research. Academic Press**, 2017. p. 1-44.

FIGUEREDO, Climério Avelino de; GURGEL, Idê Gomes Dantas; GURGEL JUNIOR, Garibaldi Dantas. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos:

Construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, p. 381-400, 2014.

GANDOLPHO, Bianca CG *et al.* Optimization of brewing waste's (trub) phenolic compounds extraction by ultrasound assisted using response surface methodology. **Química Nova**, v. 44, p. 478-483, 2021.

GÓRNIAK, Ireneusz; BARTOSZEWSKI, Rafał; KRÓLICZEWSKI, Jarosław. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 241-272, 2019.

HAMILTON-AMACHREE, Akens; UZOEKWE, Ngozy Maureen. Phytochemical analysis and assessment of the antibacterial and antioxidant activities of the aqueous and ethanolic leaf extracts of life plant (*Kalanchoe pinnata* L.) in the Niger Delta Nigeria. **Faculty of Natural and Applied Sciences Journal of Scientific Innovations**, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2022.

HOANG, Hien Thi; MOON, Ju-Young; LEE, Young-Chul. Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: recent applications, challenges and perspectives. **Cosmetics**, v. 8, n. 4, p. 106, 2021.

HONG, Mengyu *et al.* The interaction effect between tea polyphenols and intestinal microbiota: Role in ameliorating neurological diseases. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. e13870, 2022.

JAIME, Laura; SANTOYO, Susana. The health benefits of the bioactive compounds in foods. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 325, 2021.

KAMGANG, René *et al.* Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 3, p. 224-230, 2005.

KUMAR, Satish *et al.* Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. **Journal of Basic Microbiology**, 2021.

LEITE, Leni Everson de Araújo *et al.* Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 15, p. 365-380, 2012.

LIAO, Jianqing *et al.* Effects of ultrasound frequency and process variables of modified ultrasound-assisted extraction on the extraction of anthocyanin from strawberry fruit. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

LOBATO, Gerciene de Jesus Miranda *et al.* Living pharmacy in urban yards: Health care in the Amazon. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 14, n. 1, p. 120-127, 2019.

LYONS, Graham *et al.* Macro-and micronutrients from traditional food plants could improve nutrition and reduce non-communicable diseases of islanders on atolls in the South Pacific. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 942, 2020.

MACEDO, Wanderson de Lima Rodrigues. Uso da fitoterapia no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis: Revisão integrativa. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde**, 2019.

MEHATA, Mohan Singh *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Kalanchoe pinnata* leaves (life plant) and their antibacterial and photocatalytic activities. **Chemical Physics Letters**, v. 778, p. 138760, 2021.

MENSAH, M. L. *et al.* Toxicity and safety implications of herbal medicines used in Africa. **Herbal Medicine**, v. 63, p. 1992-0849, 2019.

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

NAILWAL, Devashish; VENKATASHIVA, Reddy B.; GUPTA, Arti. Patterns and predictors of complementary and alternative medicine use in people presenting with the non-communicable disease in an urban health facility, North India. **Journal of Public Health Research**, v. 10, n. 1, p. jphr. 2021.2109, 2021.

NAJMI, Asim *et al.* Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

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

OJO, Moses Ayodele. Tannins in foods: Nutritional implications and processing effects of hydrothermal techniques on underutilized hard-to-cook legume seeds—A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 27, n. 1, p. 14, 2022.

PALHARES, Rafael. *et al.* Medicinal plants and herbal products from Brazil: how can we improve quality?. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 606623, 2021.

PASA, Maria Corette *et al.* Medicinal plants in cultures of Afro-descendant communities in Brazil, Europe and Africa. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, p. 340-349, 2019.

PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PONNAMPALAM, Eric N. *et al.* The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: antioxidant action, animal health, and product quality—invited review. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 3279, 2022.

PRAKOFJEW, Julia *et al.* Diverse in local, overlapping in official medical botany: critical analysis of medicinal plant records from the historic regions of livonia and courland in northeast Europe, 1829–1895. **Plants**, v. 11, n. 8, p. 1065, 2022.

PRASATHKUMAR, Murugan *et al.* Therapeutic and pharmacological efficacy of selective Indian medicinal plants—a review. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 2, p. 100029, 2021.

- RALTE, Laldinfeli *et al.* GC–MS and molecular docking analyses of phytochemicals from the underutilized plant, *Parkia timoriana* revealed candidate anti-cancerous and anti-inflammatory agents. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2022.
- RASHID, M. I. *et al.* **Flavonoids and their biological secrets**. Plant and Human Health, Volume 2: Phytochemistry and Molecular Aspects, p. 579-605, 2019.
- RODRIGUES, Carlos Eduardo *et al.* Determination of amino acid content, fatty acid profiles, and phenolic compounds in non-conventional edible fruits of seven species of palm trees (*Arecaceae*) native to the southern half of South America. **Food Research International**, v. 162, p. 111995, 2022.
- RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira *et al.* Chemical diversity and ethnopharmacological survey of South American medicinal and aromatic plant species. **Medicinal and Aromatic Plants of South America: Brazil**, p. 17-44, 2018.
- ROSELLÓ-SOTO, Elena *et al.* Influence of temperature, solvent and pH on the selective extraction of phenolic compounds from tiger nuts by-products: Triple-TOF-LC-MS-MS characterization. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 797, 2019.
- SANTOS, Izabel Cristina dos; REIS, Simone Novaes. Edible flowers: Traditional and current use. **Ornamental Horticulture**, v. 27, p. 438-445, 2021.
- SAS, Olalla *et al.* Using bis (trifluoromethylsulfonyl) imide based ionic liquids to extract phenolic compounds. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 131, p. 159-167, 2019.
- SETYORINI, Dwi; ANTARLINA, Sri Satya. Secondary metabolites in sorghum and its characteristics. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.
- SHIRZAD, Habib *et al.* Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 8, p. 2361-2371, 2017.
- SILVA, Gicélio Ramos *et al.* Comparação do potencial antioxidante de extratos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens* aplicados em biodiesel Comparison of antioxidant potential from *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier and *Kalanchoe laetivirens* extracts applied in biodiesel. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 16998-17015, 2022.
- SILVA, Maria Sanyelle Cabral; GUEDES, João Paulo de Melo. Safety in the use of medicinal and phytotherapy plants during pregnancy. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e4611729431-e4611729431, 2022.
- SOBREIRA, Flávia *et al.* Study of the gastroprotective action and healing effects of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) against acidified ethanol-and acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 39105-39131, 2022.
- SSENKU, Jamilu E. *et al.* Medicinal plant use, conservation, and the associated traditional knowledge in rural communities in Eastern Uganda. **Tropical Medicine and Health**, v. 50, n. 1, p. 39, 2022.
- STEFANELLO, Suzana *et al.* Levantamento do uso de plantas medicinais na Universidade Federal do Paraná, Palotina–PR, Brasil. **Extensão em Foco**, v. 1, n. 15, 2018.

TAJUDIN, Nur Jannah; ISMAIL, Ismatul Nurul Asyikin. Antimicrobial activity of *Kalanchoe Pinnata*: A review. **Malaysian Journal of Science Health & Technology**, v. 8, n. 1, p. 31-37, 2022.

TAN, Bee Ling; NORHAIZAN, Mohd Esa; LIEW, Winnie-Pui-Pui. Nutrients and oxidative stress: friend or foe?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

TIRUMALA, Mounika Gayathri *et al.* Novel methods and approaches for safety evaluation of nanoparticle formulations: A focus towards in vitro models and adverse outcome pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 612659, 2021.

UDDIN, Tanvir Mahtab *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

ULLAH, Asad *et al.* Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5243, 2020.

UNUOFIN, Jeremiah Oshiomame; LEBELO, Sogolo Lucky. Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: an updated review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

VALLI, Marilia; RUSSO, Helena M.; BOLZANI, Vanderlan S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018.

VARGAS, A. *et al.* The genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Ecuador: From gardens to the wild. **Plants**, v.2022, n.11, p.1746-1748, 2022.

WANG, Yansheng *et al.* Chemical constituents and pharmacological activities of medicinal plants from Rosa genus. **Chinese Herbal Medicines**, v. 14, n.2, p. 187-209, 2022.

YUAN, Haidan *et al.* The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

ZAMYAD, Mahnaz *et al.* The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 77, p. 106-114, 2019.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Extrair compostos fenólicos do aranto (*Kalanchoe crenata*) e avaliar do potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato bruto.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições para obtenção do extrato hidroalcolico de *Kalanchoe crenata* utilizando planejamento fatorial 2⁴;
- Otimizar o processo de extração utilizando planejamento composto central (CCD);
- Determinar o conteúdo fenólico total dos extratos brutos obtidos a partir das folhas de *Kalanchoe*;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto obtido de *Kalanchoe crenata* frente à eliminação do radical DPPH, ABTS^{•+}, quelante de Cu²⁺e Fe²⁺; e
- Investigar o potencial antibacteriano e antifúngico dos extratos de *K. crenata*.

CAPÍTULO 1

Potencial antioxidante e antimicrobiano de extrato hidroalcolico obtido a partir de folhas de aranto (*Kalanchoe crenata*)

RESUMO

Espécies de *Kalanchoe* são empregadas como plantas medicinais em diversas culturas, uma vez que contém diversos compostos polifenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos com bioatividade. Dessa forma, objetivou-se otimizar o processo de extração de compostos fenólicos do aranto (*Kalanchoe crenata*) empregando planejamentos estatísticos e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano. Para a seleção de variáveis empregou-se um planejamento fatorial 2^4 com variação no tempo de sonicação, pH inicial, concentração de aranto e relação água:álcool. As variáveis com efeito significativo na extração de compostos fenólicos foram empregadas na otimização utilizando planejamento do tipo composto central. Os extratos obtidos foram submetidos a determinação de compostos fenólicos e potencial antioxidante frente aos radicais DPPH, ABTS e quelação de cobre e ferro. Posteriormente, foram realizadas as atividades antimicrobianas frente a diferentes espécies de bactérias e leveduras patogênicas. Os teores de compostos fenólicos obtidos no planejamento 2^4 variaram entre 55,00 a 460,00 mg/EAG/mg de extrato. As variáveis tempo de sonicação e concentração de aranto foram significantes para extração de compostos fenólicos, sendo empregadas na otimização, apresentando valores de compostos fenólicos entre 538,33 e 1473,89 mg/EAG/mg de extrato. Além disso, os extratos obtidos apresentaram potencial antioxidante frente ao sequestro de radicais DPPH, ABTS com 105,13–196,98 e 76,21–687,00 $\mu\text{g}/\text{EAG}/\text{mg}$ de amostra, respectivamente. E quelante de cobre e ferro com aumento após a otimização. Em relação ao potencial antibacteriano frente a *Escherichia coli* (41,55%; $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), *Salmonella. typhimurium* (73,19 e 49,31; 2 e 1 e $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) e *S. aureus* (49,60 e 10,64%; 1 e $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente). Além disso, inibiu o crescimento de *Candida tropicalis* e *C. fomata*. Dessa forma, os extratos de *Kalanchoe crenata* apresentaram potencial antioxidante, antibacteriano e antifúngico significativos, o que pode indicar possível aplicação em alimentos e formulações farmacêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais vegetais. Bactérias Gram-positivas. Bactérias Gram-negativas. *Kalanchoe sp.*

ABSTRACT

Kalanchoe species are used as medicinal plants in various cultures and contain several polyphenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids with bioactivity. Therefore, the aim was to optimize the extraction process of phenolic compounds from Aranto (*Kalanchoe crenata*) using a central substance scheduling and to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of the extracts obtained. A 2^4 -factorial design with variation in sonication time, initial pH, cranberry concentration, and water:alcohol ratio was used for variable selection. The variables with significant effect on phenolic compound production were used in the optimization using the central compound design. The extracts obtained were subjected to the determination of phenolic compounds and antioxidant potential against DPPH and ABTS radicals,

chelation of copper and iron, and later evaluated for their antibacterial and antifungal potential. The phenolic compound contents obtained in schedule 24 ranged from 55.00 to 460.00 mg/ EAG /mg of extract. The variables sonication time and concentration of cranberry were significant for the extraction of phenolic compounds and were used in the optimization, where values of phenolic compounds ranging from 538.33 to 1473.89 mg/ EAG /mg of extract were observed. In addition, the extracts obtained showed antioxidant potential against DPPH and ABTS radicals and chelation of copper and iron, which increased after optimization. As for the antibacterial potential against *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus*. It also inhibited the growth of *Candida tropicalis* and *C. fomata*. Finally, the extracts of *Kalanchoe crenata* showed significant antioxidant and antibacterial potential, which could indicate a possible application in food and pharmaceutical formulations.

KEY WORDS: Natural plant products. Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria. *Kalanchoe* sp.

1. INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Kalanchoe* são nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América e Oceania. Em boa parte do globo, as espécies de *K. pinnata* e *K. daigremontiana*, bem como outras espécies, são cultivadas, sobretudo, como plantas ornamentais. No entanto, várias espécies do gênero são plantas medicinais bastante conhecidas (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS; STOCHMAL, 2017).

Na cultura popular e na medicina tradicional o uso de plantas desse gênero é recomendado para uma gama de doenças, incluindo úlceras gástricas, cálculos renais artrite reumatoide, infecções bacterianas ou virais, doenças de pele, resfriado e outros distúrbios (FERNANDES *et al.*, 2019). Os usos etnomedicinais, em países africanos e asiáticos, das preparações derivadas de *Kalanchoe* sp. baseiam-se principalmente na administração interna ou externa de extratos brutos ou suco de planta (FURER *et al.*, 2016; KUMAR; MALIK; DUBEY, 2020).

O potencial antioxidante dos compostos vegetais está ligado às propriedades redox de compostos fenólicos, que atuam como agentes redutores, doadores de prótons e inibidores e/ou estabilizadores de radicais livres. A atividade antioxidante de polifenóis é exercida por vários mecanismos, embora muitos deles ainda não estejam elucidados, alguns têm a capacidade de eliminar radicais livres e quelar íons metálicos, atuam como cofatores de enzimas que catalisam reações oxidativas, inibem oxidases, terminam reações em cadeia de radicais e estabilizam radicais livres (EFFAH-YEBOAH *et al.*, 2021).

As pesquisas voltadas ao estudo da relação entre os radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), e o aparecimento de doenças neurodegenerativas como câncer, fisiopatologias associadas ao diabetes, dentre outras, tem aumentado (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020). Algumas das ERO mais relevantes são hidroxila, superóxido, peróxido de hidrogênio e hipoclorito. Além destes, espécies reativas de nitrogênio (ERN) também desempenham papel importante na formação do estresse oxidativo (BOGUCA-KOCKA *et al.*, 2018). Sabe-se que os antioxidantes, que atuam na eliminação dos radicais livres, desempenham papel importante na prevenção de doenças induzidas por ERO e ERN (GULCIN; ALWASEL, 2022).

Além disso, Investigações revelaram que compostos fenólicos de fontes naturais exibem uma potente atividade antimicrobiana contra vários patógenos clinicamente relevantes associados à infecção microbiana e sensibilizam cepas multirresistentes a antibióticos bactericidas ou bacteriostáticos. Embora existam muitos aspectos a serem esclarecidos sobre as relações estrutura-função de muitos compostos já descobertos ou ainda a serem descobertos (ECEVIT *et al.*, 2022).

Kalanchoe crenata contém diversos compostos polifenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos que apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas, tais como antidiabética, antibacteriana, anti-inflamatória, anticonvulsiva, antioxidante, antinociceptiva, hepatoprotetora, antitumoral e atividades nefroprotetoras (GUZZI *et al.*, 2014; SAHIN *et al.*, 2019; EFFAH-YEBOAH *et al.*, 2021; MADARIAGANAVARRETE *et al.*, 2021; OSMAN *et al.*, 2022; SARMENTO-FILHA *et al.*, 2022). No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar as melhores condições para extração, confirmar a caracterização de fitoconstituintes e atividades biológicas das espécies de *Kalanchoe* para uso futuro em suplementos alimentares e outras aplicações farmacêutica.

Desta forma, este estudo foi conduzido com o propósito de otimizar o processo de extração de compostos fenólicos do aranto (*Kalanchoe crenata*) empregando planejamentos estatísticos e avaliar o potencial antioxidante, antibacteriano e antifúngico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do material vegetal, delineamento experimental e processo de extração

As folhas de *Kalanchoe crenata* foram obtidas no município de Jupi (8° 42' 23" Sul, 36° 25' 3" Oeste), realizada a produção de uma exsicata, sendo enviada ao herbário do Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco sob nº 93850. As folhas foram secas em estufa a 65 °C até peso constante, posteriormente, trituradas e tamisadas empregando peneiras de 18 Mesh para obtenção do pó utilizado na produção do extrato bruto. O material vegetal encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) com o número de cadastro AB3DF4E.

2.2. Delineamento experimental e processo de extração

Para a extração dos compostos fenólicos, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial 2⁴, segundo Oliveira *et al.* (2018), com modificações. Foram empregadas quatro variáveis: diferentes tempos de sonicação (X_1); pH inicial (X_2); concentração de aranto (X_3) e relação água:álcool (X_4), como observado na tabela 1.

De acordo com cada ensaio da matriz de planejamento fatorial as amostras das folhas secas e trituradas de *Kalanchoe crenata* (aranto) foram dispensados em diferentes concentrações (v/v) de água:álcool, o pH inicial de cada ensaio foi ajustado empregando HCl e NaOH a 0,1 M e mantendo-se em agitação por 30 minutos em agitador orbital a 37 °C, e posteriormente, submetidos a sonicação (40 Hertz). Decorrido o tempo de cavitação acústica, os extratos foram resfriados, centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para clarificação. Os sobrenadantes foram congelados e liofilizados para análises posteriores.

2.3. Otimização empregando Metodologia de Superfície Resposta para extração de compostos fenólicos

Após a realização do planejamento fatorial 2⁴, as variáveis significativas foram utilizadas no processo de otimização da extração dos compostos fenólicos de aranto

(*Kalanchoe crenata*). Para isso empregou-se um planejamento composto central (CCD). O CCD consistiu em 12 ensaios, incluindo 4 pontos centrais, 4 pontos axiais e 4 pontos fatoriais

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^4 para extração de compostos fenólicos de *Kalanchoe crenata*.

Variáveis independentes	Valores reais		
	Mínimo (-)	Central (0)	Máximo (+)
X_1 - Tempo de sonicação (min)	0	30	60
X_2 - pH inicial	4,0	6,0	8,0
X_3 - Concentração de aranto (g.L^{-1})	20	50	80
X_4 - Relação água:álcool	70:30	50:50	30:70

Para avaliar o modelo predito nas variáveis respostas (compostos fenólicos totais – CFT e atividades antioxidantes - ABTS⁺, DPPH, QCU e QFE), foi realizada uma análise de variância (ANOVA,) com nível de confiança de 95% para avaliar o efeito de cada fator (tempo de sonicação e concentração de aranto). Além disso, o coeficiente de correlação (R^2), o valor de p do modelo de regressão e o valor de p da falta de ajuste residual foram usados para determinar a adequação do modelo de regressão.

As condições otimizadas foram validadas para o teor máximo de CFT e ABTS⁺, DPPH, QCU e QFE), com base nos valores obtidos pelo CCD, empregando o *software* R. Todas as respostas foram determinadas em condições otimizadas de extração, de acordo com a metodologia descrita por Andres *et al.* (2020).

2.4. Determinação do conteúdo fenólico total

Para a determinação do conteúdo fenólico total empregou-se a metodologia desenvolvida por Singleton e Rossi (1965), adaptada para microplacas de 96 poços. A mistura reacional consistiu em 50 μL de cada extrato bruto (1 mg.mL^{-1}), 75 μL de água e 25 μL do reagente de Folin-Ciocalteu, após 1 min, 50 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20% foram adicionados e a mistura permaneceu em repouso durante 30 min à temperatura ambiente no escuro. A absorbância da mistura foi medida em leitora de microplacas (ASYS, UVM 340 Thermo Fisher Scientific, EUA) a 750 nm.

Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de ácido gálico (0,312 - 1 mg.mL⁻¹) e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes por mL de extrato (mg eEAG.mL⁻¹ de extrato).

2.5. Determinação de flavonoides totais

Para determinação do teor de flavonoides totais empregou-se a metodologia desenvolvida por. Nesta, a mistura reacional consistiu de 500 µL dos extratos a 1 mg.mL⁻¹, 500 µL de solução alcoólica (96 GL) de cloreto de alumínio a 2%, posteriormente agita-se em vórtex por 10 minutos, e incubou-se por 60 minutos a 25 °C na ausência de luz. Decorrido esse tempo, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotometro a 420 nm (Biochrom, Libras S22, Inglaterra) O teor de flavonoides totais foi expresso em mg de quercetina equivalentes por mL de extrato (mg quercetina.mL⁻¹ de extrato).

2.6. Avaliação do potencial antioxidante

2.6.1. Ensaio de eliminação do radical DPPH

O potencial de captura do radical DPPH, frente aos diferentes extratos de *K. crenata* foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Gawron-Gzella, Dudek-Makuch e Matlawska (2012), adaptada para microplacas. A mistura reacional consistiu em 100 µL da amostra (1 mg.mL⁻¹) e 100 µL da solução de DPPH (0,1 mM em metanol 95%) em microplaca de 96 poços. A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. protegida da luz, e a absorbância foi mensurada a 517 nm empregando leitora de microplaca (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A habilidade de eliminação do radical DPPH foi calculado usando a equação 2:

$$\text{Eliminação do radical DPPH(\%)} = \left(\frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, A_{Amostra} é a absorbância das amostras, A_{Controle} é a absorbância da amostra que contém água. Os resultados foram expressos em equivalência de ácido gálico com base em curva padrão com concentrações entre 10 a 500 µg.mL⁻¹.

2.6.2. Ensaio de eliminação do radical ABTS^{•+}

O ensaio de atividade antioxidante para a eliminação do radical cátion ABTS^{•+}, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) 7 mM, com persulfato de potássio 2,45 mM, pré-incubados ao abrigo da luz por 12 horas antes da utilização. A solução ABTS^{•+} foi ajustada para absorvância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm em leitora de microplaca (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), por diluição em tampão fosfato salino 5 mM, sendo realizado de acordo com metodologia descrita por Re *et al.* (1999), adaptada para microplacas. Uma alíquota de 50 μL da amostra contendo os compostos fenólicos na concentração de 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi misturada a 150 μL da solução diluída de ABTS, a mistura reacional foi incubada por 10 minutos ao abrigo da luz a temperatura ambiente. A absorvância da reação foi mensurada a 734 nm empregando leitora de microplaca (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A atividade de eliminação do radical ABTS foi calculada de acordo com a mesma equação utilizada para calcular a eliminação do radical DPPH (Equação 1).

2.6.3. Atividade de quelção de Fe²⁺

A capacidade dos extratos em quelar Fe²⁺ foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Carter (1971), adaptada para microplacas. Inicialmente, 50 μL das amostras contendo os compostos fenólicos na concentração de 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram colocados em microplacas de 96 poços em triplicata. Em seguida, 160 μL de água ultrapura e 20 μL de uma solução de FeSO₄ 0,30 mM foram adicionados em cada poço, seguido pela adição de 30 μL de uma solução de ferrozina 0,80 mM, após 5 min de reação. No controle negativo e positivo empregou-se 50 μL água destilada e EDTA 0,045%, respectivamente. A absorvância da atividade foi mensurada a 562 nm empregando leitora de microplaca (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), após 15 min de incubação. A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação 3:

$$\text{Quelação de Fe}^{2+} = \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de EDTA (0,312 - 1 mg.mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg equivalente de EDTA/mL.

2.6.4. Atividade de quelação de Cu²⁺

A capacidade dos extratos em quelar Cu²⁺ foi avaliada usando o método que emprega violeta de pirocatecol (PV), como agente cromógeno (CARRASCO-CASTILLA *et al.*, 2012). Em cada poço, 30 µL das amostras contendo os compostos fenólicos na concentração de 1 mg.mL⁻¹ ou água (controle negativo) foram misturados com 200 µL de tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 6,0), em triplicata. Em seguida, 30 µL de uma solução de 100 mg.mL⁻¹ de CuSO₄·5H₂O foram adicionados em cada poço e deixados reagir por 2 min., quando 8,5 µL de uma solução de PV (2 mM) foram adicionados para iniciar a reação. A microplaca foi encubada por 20 minutos a 25 ± 2 °C, e a absorbância foi mensurada a 632 nm empregando leitora de microplaca (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação 4:

$$\text{Quelação de Cu}^{2+} = \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de EDTA (0,312 - 1 mg.mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg equivalente de EDTA.mL⁻¹.

2.7. Atividade antimicrobiana

Para atividade antimicrobiana o extrato bruto foi preparado de acordo com as condições selecionadas na etapa de otimização. Empregou-se a metodologia proposta por Wu *et al.* (2013), contendo modificações. Neste estudo, concentrações de 0,0625 a 2 mg.mL⁻¹ do extrato bruto foram analisados frente a quatro bactérias, duas gram negativas *Escherichia coli* ATCC 8779, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e duas gram positivas *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e frente três espécies de leveduras, sendo *Candida tropicalis* URM 6947, *C. fomatata* URM 7096 e *C. albicans* URM 7097. Primeiramente, as bactérias e

as leveduras em estoque foram ativadas em caldo triptona de soja por 12 horas a 37 °C, em estufa bacteriológica. Os ensaios consistiram de 100 µL da amostra, 90 µL de caldo Mueller Hinton e 10 µL de suspensão bacteriana e leveduriforme, previamente padronizada a 10⁸ UFC.mL⁻¹ em espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis. Para efeito de cálculo, um controle negativo foi realizado com água destilada estéril no lugar da amostra, seguindo as mesmas condições dos demais testes, além disso, foi realizado um controle de cor já que os extratos apresentam coloração que poderiam influenciar negativamente nos resultados. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e incubados durante 24 horas a 37 °C. Transcorrido o tempo, as absorbâncias das amostras foram mensuradas a 600 nm. A atividade microbiana foi expressa em porcentagem de inibição de crescimento (%) e calculada através da equação 5:

$$Atividade\ antimicrobiana(\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde, $A_{controle}$ foi a absorbância do controle negativo, com água estéril no lugar das amostras e $A_{amostra}$ foi absorbância dos extratos brutos, nas variadas concentrações.

2.8. Análise estatística

Os resultados do planejamento fatorial 2⁴ e o planejamento composto central foram submetidos à análise de variância pelo método ANOVA, a nível de significância de 95% utilizando o *Statistica 12.0 free version* e o *Software R* empregando compostos fenólicos como variável dependente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a extração dos compostos fenólicos totais (CFT), para o planejamento fatorial 2⁴ observou-se uma variação entre 55 a 460 µg.EAG.mg⁻¹ de amostra, Tabela 2. Báez *et al.* (2021), ao avaliarem o uso de diferentes percentuais de solvente na extração de compostos fenólicos extraídos de folhas de *Kalanchoe daigremontiana* obtiveram menor concentração que o presente, sendo de 11,04 ±0,10, 14,07±0,24 e 12,00 ±0,12 µg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto, empregando concentrações

de solvente de 50, 70 e 80% de álcool, semelhantes as utilizadas no presente estudo. Esses mesmos autores observaram potencial de eliminação de radical DPPH[•] e ABTS^{•+} entre 3,00 e 84,1 µg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto, levemente superiores aos obtidos no presente estudo no qual observou-se potencial de eliminação do radical ABTS^{•+} entre de 5,06 a 28,63 µg.EAG.mg⁻¹ de amostra, bem como para o sequestro do radical DPPH[•], entre de 21,61 a 69,23 µg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto. A diferença no potencial observado no presente estudo e no estudo de Báez *et al.* (2021) pode estar associado a presença de diferentes classes de compostos fenólicos que atual como antioxidante com diversos mecanismos, dentre os quais, indução de enzimas antioxidantes como o observado na quelação de metais, supressão de espécies reativas de oxigênio como observadas no sequestro de ABTS e DPPH (MORAES *et al.* (2022).

A quelação de cobre e ferro variou de 42,40 a 108,83 e 10,42 a 69,15 µg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto, respectivamente, demonstrando a presença de compostos fenólicos capazes de formar quelatos, ou seja, podem se ligar aos íons férricos e favorecer a biodisponibilidade e a bioacessibilidade desses compostos. Para Lakey-Beitia *et al.* (2021), a capacidade de quelar metais encontrada nos ensaios 10 e 14, por exemplo, pode estar associado a presença de grupos químicos como catecol, hidroxilas e outros compostos que podem doar e receber elétrons facilmente, o que favorece a ligação entre os íons metálicos e os compostos fenólicos.

De acordo com Moura *et al.* (2018), apontam que as diferenças observadas no potencial antioxidante entre os ensaios de eliminação radicalares de compostos presentes em espécies de *Kalanchoe* se devem à grande diversidade de compostos químicos presentes nas folhas dos vegetais, e que são extraídos em diferentes condições, como aquelas observadas no planejamento fatorial 2⁴ do presente estudo.

Tabela 2. Fatores experimentais e valores obtidos das variáveis resposta empregadas no planejamento fatorial 2^4 frente a extração de compostos fenólicos a partir de folhas de *Kalanchoe crenata*.

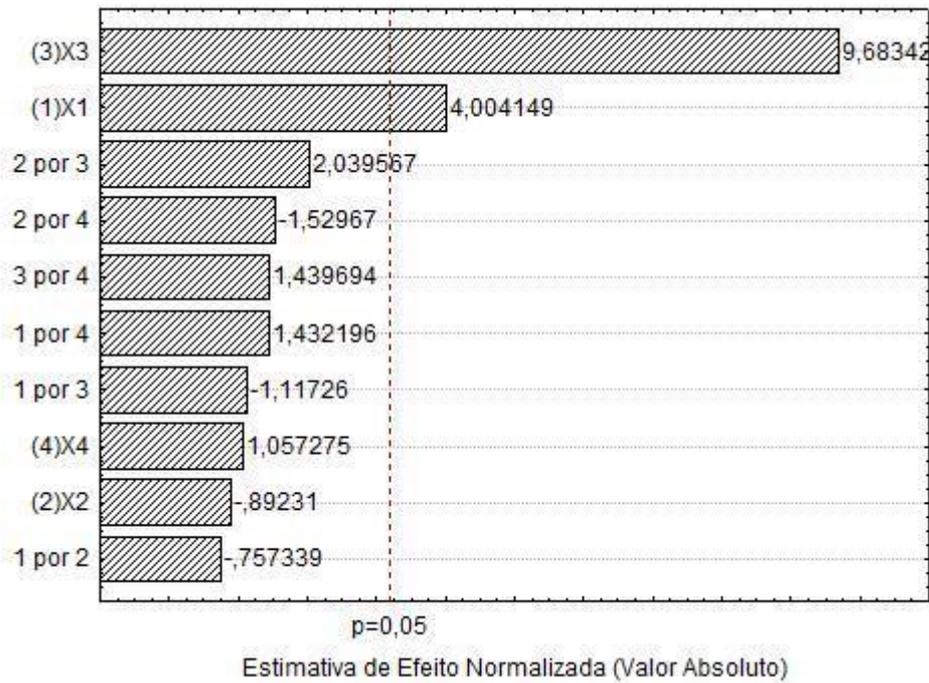
ENSAIO	Variáveis independentes				Variáveis dependentes*				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	^a CFT	^a ABTS ^{••}	^a DPPH	^b QCU	^b QFE
1	0	4	20	70:30	173,89	17,51	46,77	47,33	31,13
2	60	4	20	70:30	223,89	16,53	44,79	43,44	32,33
3	0	8	20	70:30	165,00	16,22	44,15	46,61	31,53
4	60	8	20	70:30	220,56	16,69	45,10	54,55	10,42
5	0	4	80	70:30	308,33	11,07	33,75	45,90	17,80
6	60	4	80	70:30	402,22	28,63	69,23	52,48	22,01
7	0	8	80	70:30	389,44	13,08	37,80	51,61	24,07
8	60	8	80	70:30	380,56	25,77	63,44	58,99	22,40
9	0	4	20	30:70	185,56	21,72	55,26	58,91	22,33
10	60	4	20	30:70	294,44	14,37	40,42	62,33	42,64
11	0	8	20	30:70	55,00	26,59	65,10	42,40	25,50
12	60	8	20	30:70	220,00	16,61	44,94	48,04	69,15
13	0	4	80	30:70	360,00	10,32	32,25	77,01	36,77
14	60	4	80	30:70	460,00	5,81	23,12	108,83	25,02
15	0	8	80	30:70	408,33	5,06	21,61	80,10	26,69
16	60	8	80	30:70	437,22	6,24	23,99	106,77	37,25
17	30	6	50	50:50	317,78	15,98	43,67	54,79	30,34
18	30	6	50	50:50	404,44	9,77	31,13	65,34	25,50
19	30	6	50	50:50	340,00	12,60	36,85	58,52	20,58
20	30	6	50	50:50	363,33	10,25	32,09	59,94	19,63

X1: tempo (min); X2: pH inicial; X3: concentração de aranto em g.L⁻¹; X4: relação álcool: água; a determinadas em µg/EAG/mg de amostra; b determinadas em µg/eqEDTA/mg de amostra

A análise de variância (ANOVA) da variável dependente composto fenólicos totais, demonstrou que as variáveis X₁ e X₃ (Figura 1) apresentaram efeitos positivos significativos no processo extrativo o que pode indicar que acréscimos de tempo e de concentração acarretará no aumento dos compostos fenólicos.

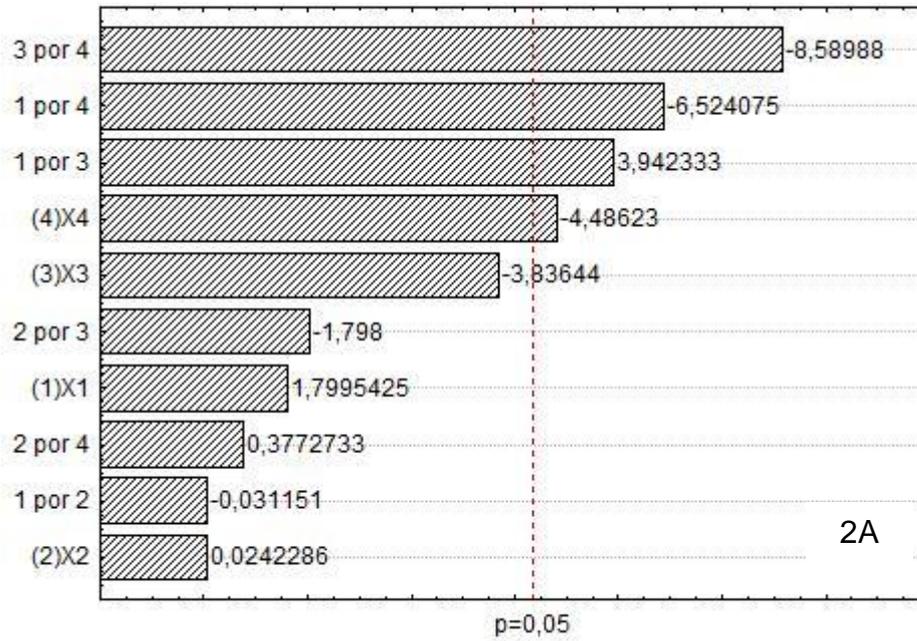
Em relação ao potencial antioxidante (Figura 2), observou-se efeito significativo para a variável X₄ com efeito negativo para os radicais ABTS^{••} (Figura 2a) e DPPH[•] (Figura 2b), e positivo para a atividade quelante de Cu²⁺ (Fig.2c) e Fe²⁺ (Figura 2d). Ademais, as variáveis X₁ e X₃ apresentaram efeito significativo positivo para a quelação de ferro.

Figura 1. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados para as variáveis X1 -Tempo de sonicação (min), X2 - pH inicial, X3 -Concentração de aranto (g/L), X4 -Relação água:álcool testadas com interações para extração de compostos fenólicos.

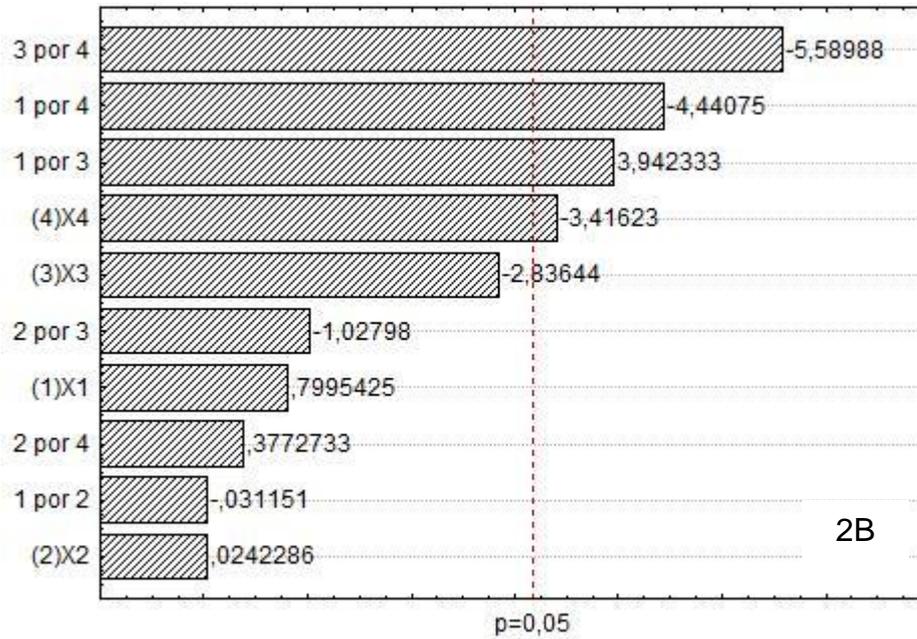


Fonte: Autor, 2022.

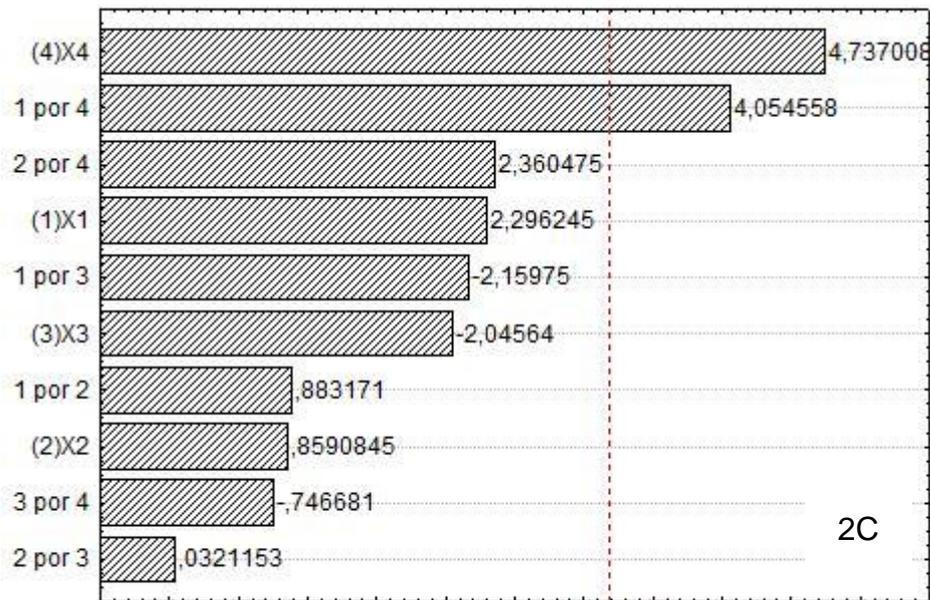
Figura 2. gráfico de Pareto com os efeitos estimados para as variáveis X1 -Tempo de sonicação (min), X2 - pH inicial, X3 -Concentração de aranto (g.L⁻¹), X4 -Relação água:álcool testadas com interações para o potencial antioxidante frente aos radicais ABTS^{••} (fig. 2a), DPPH (fig. 2b) e quelação com cobre (fig. 2c) e ferro (fig. 2d) dos compostos fenólicos extraídos de *Kalanchoe crenata*.



Estimativa de Efeito Padronizada (Valor Absoluto)

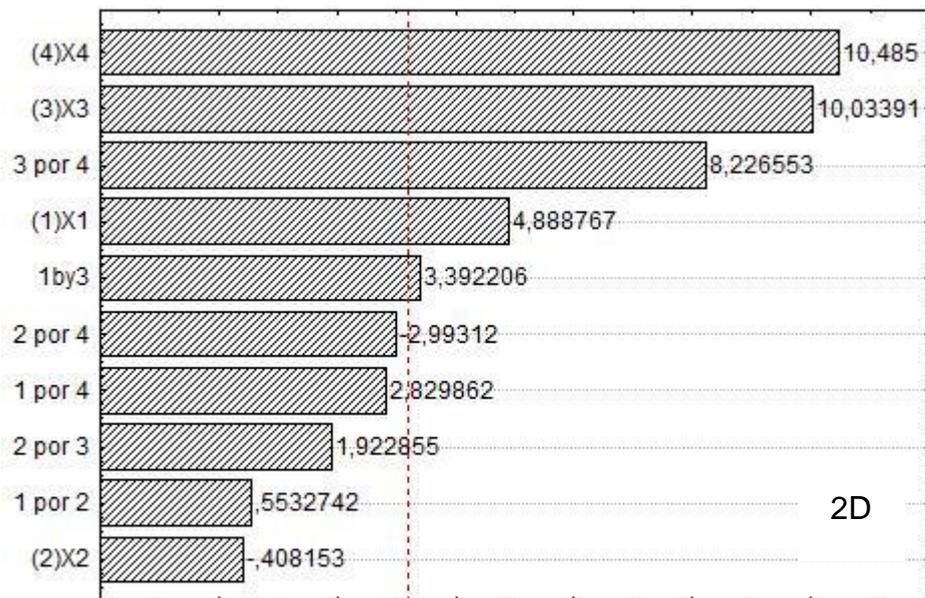


Estimativa de Efeito Padronizada (Valor Absoluto)



p=0,05

Estimativa de Efeito Padronizada (Valor Absoluto)



p=0,05

Estimativa de Efeito Padronizada (Valor Absoluto)

Fonte: Autor, 2022.

As variáveis *X1* e *X3* que apresentaram efeito significativo positivo na extração de compostos fenólicos foram empregadas na otimização e após esse processo obteve-se resultados variaram entre 538,33 e 1473,89 $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ (Tabela 3), uma vez que o potencial antioxidante e antimicrobiano está ligado diretamente à presença de composto fenólicos nos extratos (FOSS; PRZYBYŁOWICZ; SAWICKI, 2022).

A otimização do processo de extração foi realizada aplicando equações polinomiais de segunda ordem empregando um planejamento composto central. O modelo apresentou coeficiente de determinação para compostos fenólicos ($R^2= 0,88$).

As atividades de eliminação dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] (Tabela 3), aumentaram substancialmente em relação ao planejamento fatorial, demonstrando atividades 105,13–196,98 e 76,21–687,00 $\mu\text{g.EAG.mg}^{-1}$ de amostra, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para quelação com cobre, que variou de 54,32–420,18 $\mu\text{g.eqEDTA.mg}^{-1}$ de amostra, e quelação com ferro, cuja variação manteve-se entre 71,05–587,24 $\mu\text{g.eqEDTA.mg}^{-1}$ de amostra, demonstrando dessa forma que o processo de extração foi otimizado ao empregar o delineamento composto central (CCD), além disso, observou-se que o aumento na quantidade de CFT extraída acarretou em aumento no potencial antioxidante, bem como, na presença de compostos com provável potencial de inibir o crescimento microbiano.

Tabela 3. Fatores experimentais empregados no planejamento composto central (CCD) e valores obtidos das variáveis resposta frente a produção de extrato hidroalcolólico bruto a partir de folhas de *Kalanchoe crenata*.

Variáveis							
Independentes			Dependentes				
Ensaio	X ₁	X ₃	^a CFT	^a ABTS ^{•+}	^a DPPH	^b QCU	^b QFE
1	60	80	538,33	138,83	372,56	54,23	71,05
2	240	80	1013,89	133,70	136,84	167,88	250,65
3	60	240	653,89	132,05	687,00	102,08	344,07
4	240	240	1473,89	134,52	485,81	420,18	587,24
5	22,74	160	888,89	105,13	335,97	70,89	153,43
6	277,26	160	1275,56	196,98	76,21	77,32	253,27
7	150	46,88	683,33	115,61	605,65	138,91	211,37
8	150	273,12	829,44	181,98	166,77	173,11	215,34
9	150	160	943,89	160,82	268,99	171,45	157,64
10	150	160	1016,67	122,39	293,59	202,56	206,13
11	150	160	1016,67	186,30	294,94	193,59	193,91
12	150	160	1191,67	134,11	272,24	162,80	152,16

^a determinadas em $\mu\text{g/EAG/g}$ de amostra; ^b determinadas em mg/eqEDTA/mg de amostra

Os coeficientes de regressão, que buscam a relação entre uma ou mais variáveis e a variável resposta, (Tabela 4) para as variáveis dependentes foram obtidas por regressões múltiplas. Observou-se que o efeito linear positivo para o

tempo de sonicação (X_1) foi significativo para compostos fenólicos totais, quelação de metais e negativo para o sequestro do radical ABTS^{•+}, bem como efeito linear positivo da concentração de aranto (X_3) para a quelação de cobre e ferro. O efeito de interação de $X_{1,3}$ encontrado foi significativo apenas para a atividade quelante de cobre. O efeito quadrático de X_1 produziu efeito positivo e negativo para as variáveis quelante de cobre e ferro, respectivamente. O efeito quadrático de X_3 encontrado produziu efeito significativo para as variáveis compostos fenólicos (negativo) e para a eliminação do radical DPPH[•] e quelação com ferro (positivo). Para Silva *et al.* (2012), os resultados obtidos na análise de regressão indicam que a seleção das variáveis depende da atividade biológica desejada.

Tabela 4. Coeficiente de regressão (β), coeficiente de determinação (R^2) dos modelos polinomiais de segunda ordem previstos para compostos fenólicos, ABTS^{•+}, DPPH[•] e quelação com ferro (QFe) e cobre (QCu) dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Kalanchoe crenata*.

Coeficientes de regressão (β)					
	Compostos fenólicos	ABTS	DPPH	QCu	QFe
Intercepto					
X_0	1109,03*	*151,50	250,65*	196,22*	193,73*
Linear					
X_1	603,49*	36,96	-262,76*	116,05*	206,21*
X_3	231,22	34,26	14,28	108,31*	160,41*
Interação					
$X_{1,3}$	207,87	-1,61	20,84	123,38*	38,36
Quadrático					
X_1^2	-63,06	-11,69	45,21	-156,57*	119,87*
X_3^2	-276,50*	8,22	162,42*	18,63	86,60*
R ²	0,88	0,32	0,37	0,63	0,57

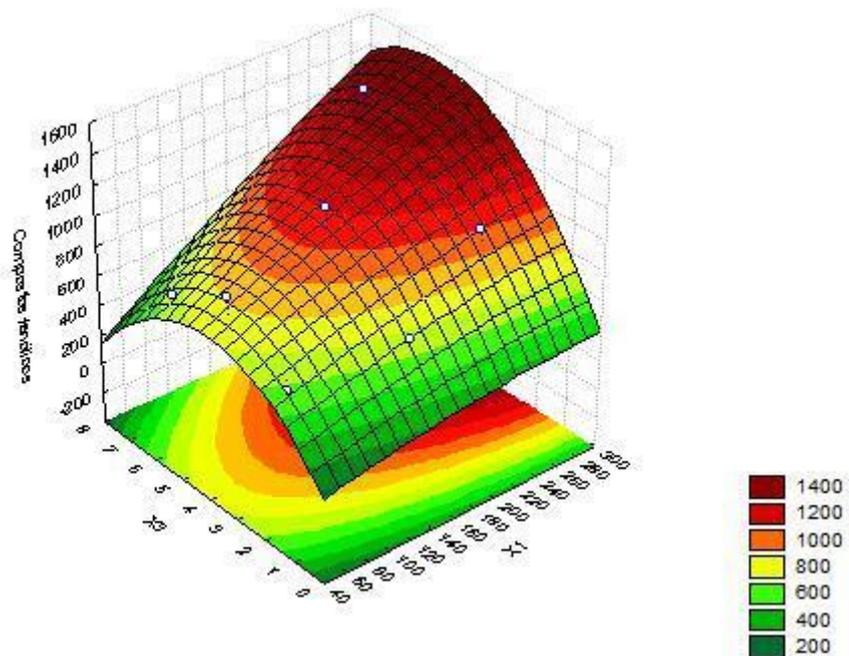
Nível de significância * $p < 0,05$. X_1 = Tempo de sonicação (min), X_3 = Concentração de aranto (g.L^{-1}); DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil radical; ABTS = 2,2'-azino-bis (3-etilbenotiazolona-6-ácido sulfônico); QCu= quelação de cobre; QFe= quelação de ferro; R² = Coeficiente de determinação.

Os resultados da ANOVA, Tabela 4, para a variável compostos fenólicos, que influencia diretamente na atividade antioxidante, indicaram que os dois parâmetros (concentração de aranto e tempo de sonicação) do modelo podem explicar a variação experimental das variáveis respostas. A falta de teste de ajuste não foi significativa, indicando que o modelo poderia se encaixar adequadamente nos dados experimentais para essa variável resposta.

A relação entre compostos fenólicos e as variáveis empregadas no processo, Figura 3, demonstrou que a maior extração ocorreu nos tempos de sonicação

analisados no estudo e concentração de aranto entre 3 e 6 g.L⁻¹. Nessas condições o teor de flavonoides total foi de 24,24 mg de equivalentes de quercetina por mg de amostra. De acordo com Liu *et al.* (2017), a onda de ultrassom gera fenômeno de cavitação, a transferência de massa aumenta e, portanto, mais compostos fenólicos podem ser extraídos do tecido perturbado, essa perturbação pode ser influenciada pelo tempo de exposição, viscosidade, concentração do soluto e polaridade do solvente.

Figura 3. Efeitos do tempo de sonicação e da concentração de aranto sobre os compostos fenólicos totais em extratos de folhas de *Kalanchoe crenata* representados por gráfico de superfície resposta.



O extrato bruto das folhas de *Kalanchoe crenata* obtidos pela suspensão de 240 g de folhas em álcool 70%, pH 8,0 e submetidos à sonicação por 240 minutos, com base no melhor ensaio de otimização, foram capazes de inibir parcialmente o crescimento de bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* e *S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*), tabela 5. Observou-se que as maiores concentrações do extrato bruto apresentaram maior potencial de inibição. O extrato inibiu o crescimento com a concentração de 2 mg.mL⁻¹ frente à *E. coli*, com potencial de inibição de 41,55%. Contra as bactérias *S. typhimurium* (gram-negativa) e *S. aureus* observou-se inibição entre 49,31 - 73,19% e 10,64 - 49,60%, respectivamente.

A bactéria *B.cereus* não foi inibida pelo extrato hidroalcoólico nas concentrações testadas.

De acordo com Tamokou, Mbaveng e Kuete (2017) e Álvarez-Martínez *et al.* (2021), estima-se que os extratos são muito ativos quando apresentam valores de CIM $< 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ significativamente ativos se $0,10 \leq \text{CIM} \leq 0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$, moderadamente ativo se $0,50 < \text{CIM} \leq 2,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ e sem atividade antimicrobiana se o $\text{CIM} > 2,00 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nesse sentido, os extratos de *Kalanchoe crenata* empregados no presente estudo apresentam atividade antimicrobiana moderada, uma vez que, a o maior potencial de inibição frente as bactérias testadas encontra-se entre 1 e 2 mg.mL^{-1} .

Tabela 5. Atividade antibacteriana (%) de diferentes concentrações compostos fenólicos de *Kalanchoe crenata* frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Concentração (mg.mL^{-1})	Espécies bacterianas			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	41,55 (+)	73,19 (+)	0,00 (-)	49,60 (+)
1	0,00 (-)	49,31 (+)	0,00 (-)	10,64 (+)
0,5	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)
0,25	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)
0,125	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)
0,0625	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)

Com inibição (+); Sem inibição (-)

Em estudos realizados por Richwagen *et al.* (2019), os extratos de folha de *K. fedtschenkoi* demonstraram efeitos inibitórios do crescimento contra duas espécies Gram-negativas, *Acinetobacter baumannii* (cepa CDC-33) e *Pseudomonas aeruginosa* (AH-71), bem como frente a gram-positivas como o *S. aureus* (UAMS-1) em concentrações entre 128 e 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em extrato hidroalcoólico. Resultados semelhantes também foram observados em estudos realizados por Sahin *et al.*, (2019), que observaram inibição tanto de gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*) quanto de gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), frente a extratos de *K. crenata* na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em extrato metanólico. O potencial antibacteriano observado nos estudos anteriores pode estar associado a presença de alcaloides, terpenos, glicosídeos e flavonoides no extrato bruto de folhas do gênero *Kalanchoe* (AKINPELU, 2000; OKWU; JOSIAH, 2006), uma vez que este grupo de

polifenóis pode interagir com o fosfolípido da membrana plasmática e perturba a sua funcionalidade (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021) o que pode indicar que no extrato bruto obtido no presente estudo não há presença de alguns desses compostos.

Ainda com relação a atividade antimicrobiana, observou-se na tabela 6, que o extrato obtido de aranto (*Kalanchoe crenata*) foi capaz de inibir o crescimento de *Candida tropicalis* com inibição entre 16,79 e 88,45% e de *Candida fomata* com inibição de 22,85%.

Tabela 6. Atividade antifúngica (%) de diferentes concentrações compostos fenólicos de *Kalanchoe crenata* frente a leveduras da cavidade oral

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Espécie leveduriforme		
	<i>Candida tropicalis</i> URM 6947	<i>Candida fomata</i> URM 7096	<i>Candida albicans</i> URM 7097
2	88,45	22,85	0,00
1	85,40	0,00	0,00
0,5	16,79	0,00	0,00
0,25	0,00	0,00	0,00
0,125	0,00	0,00	0,00
0,0625	0,00	0,00	0,00

Com inibição (+); Sem inibição (-)

Estudos *in vitro* demonstraram que extratos hidroalcoólicos de *Kalanchoe* obtidos por arraste utilizando *soxlet* inibiram o crescimento de microrganismos (bactérias e fúngicas), mas mostraram variação quanto a eficácia de inibição observou-se inibição entre 20,83 a 83,33% frente a *Staphylococcus aureus*, entre 37,50 e 75% de inibição frente a *E. coli*, e entre 52,38 e 71,83% frente a *Candida albicans* (MANAN *et al.*, 2016; RANABHAT *et al.*, 2022). Stefanowicz-Hajduk *et al.* (2020) avaliaram a ação do *Kalanchoe daigremontiana* sobre *Candida albicans* e demonstraram que o extrato etanólico não teve ação inibitória significativa, no entanto, obteve resultados satisfatórios frente a outras espécies do gênero *Candida* dentre os quais *C. tropicalis* em concentrações menores que 0,787 mg.mL⁻¹.

4. CONCLUSÃO

Kalanchoe crenata apresenta quantidade considerável de compostos fenólicos que são facilmente extraídas empregando-se cavitação acústica. Dentre as variáveis analisadas no processo extrativo o tempo de sonicação e a concentração demonstram maior efeito sobre a extração de fenólicos totais. Dentre as condições testadas o ensaio que corresponde a suspensão de 240 g de *Kalanchoe crenata* em álcool 70%, pH 8,0 e submetidos à sonicação por 240 minutos apresentou os maiores índices frente aos ensaios radiculares e potencial antimicrobianos moderado. Os extratos obtidos possuem capacidade antioxidante frente a eliminação dos radicais DPPH e ABTS, além da quelação de cobre e ferro. Em relação a atividade antimicrobiana observa-se atividade moderadamente ativa frente as espécies bacterianas e leveduriformes testadas. Os resultados deste estudo demonstram que os extratos de *Kalanchoe crenata* podem ser usados como uma fonte prontamente acessível de antioxidante naturais e, como tal, podem ser usados como matéria prima na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- AKINPELU, David. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 193-194, 2000.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. *et al.* Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021.
- ANDRES, Ana Isabel *et al.* Optimization of extraction conditions to improve phenolic content and in vitro antioxidant activity in craft brewers' spent grain using response surface methodology (RSM). **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1398, 2020.
- BÁEZ, Margarita *et al.* Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 50, n. 1, p. 86-99, 2021.
- BOGUCKA-KOCKA, Anna *et al.* Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 622-630, 2018.
- CARRASCO-CASTILLA, Janet *et al.* Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1789-1795, 2012.

CARTER, Paul. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 450-458, 1971.

DE OLIVEIRA, Magno *et al.* Experimental planning factorial: a brief review. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 5, n. 6, p. 264164, 2018.

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

FERNANDES, Júlia M. *et al.* *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 529-558, 2019.

FOSS, Kamil; PRZYBYŁOWICZ, Katarzyna E.; SAWICKI, Tomasz. Antioxidant activity and profile of phenolic compounds in selected herbal plants. **Plant Foods for Human Nutrition**, p. 1-7, 2022.

FÜRER, Karin *et al.* *Bryophyllum pinnatum* and related species used in anthroposophic medicine: constituents, pharmacological activities, and clinical efficacy. **Planta Medica**, v. 82, n. 11/12, p. 930-941, 2016.

GAWRON-GZELLA, Anna; DUDEK-MAKUCH, Marlena; MATLAWSKA, Irena. DPPH radical scavenging activity and phenolic compound content in different leaf extracts from selected blackberry species. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, v. 54, n. 2, 2012.

GULCIN, İlhami; ALWASEL, Saleh H. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. **Processes**, v. 10, n. 1, p. 132, 2022.

GUZZI, Silvana *et al.* Development and stability study of *Kalanchoe crenata* semi-solid formulation and its positive effect on the inflammatory response induced by *Leishmania braziliensis* in mice. **Artigo Original/Research. Brasil**, v. 95, n. 2, p. 748-769, 2014.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, Joanna; STOCHMAL, Anna. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 6, p. 1155-1171, 2017.

KUMAR, Punit; MALIK, Sujata; DUBEY, Kashyap K. *Bryophyllum Pinnatum*: A Review on Medicinal Benefits and Potent Bioactive Molecules. **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n. 7, p. 978-992, 2020.

LAKEY-BEITIA, Johant *et al.* Polyphenols as potential metal chelation compounds against Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 82, n. s1, p. S335-S357, 2021.

LIU, Yong *et al.* Ultrasonic-extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus urinaria*: optimization model and antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 286-293, 2017.

MADARIAGA-NAVARRETE, Alfredo *et al.* *Kalanchoe daigremontiana*: Functional properties and histopathological effects on wistar rats under hyperglycemia-inducing diet. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 55, n. 2, p. 445-454, 2021.

MANAN, Maria *et al.* antimicrobial activity of *Kalanchoe laciniata*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 4, p. 1321-4, 2016.

MORAES, Giovanna Vizzaccaro *et al.* Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e238111436225-e238111436225, 2022.

MOURA, Cristiane *et al.* Optimization of phenolic compounds extraction with antioxidant activity from açai, blueberry and goji berry using response surface methodology. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 180-189, 2018.

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.

OSMAN, Ezzat EA *et al.* Phytochemical investigations, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antibiofilm activities of *Kalanchoe laxiflora* flowers. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 49, p. 102085, 2022.

RANABHAT, Keshav *et al.* Evaluation of antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities and correlation with phytoconstituents in some medicinal plants of Nepal. **Journal of Chemistry**, v. 2022, 2022.

RE, Roberta *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

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

SAHIN, Ali Z. *et al.* Antimicrobial activity of natural compounds from *Kalanchoe crenata* against pathogenic bacteria. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, p. 1-4, 2019.

SARMENTO-FILHA, Maria José *et al.* Phytochemical analysis by UPLC-QTOF-MS/MS and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the extract and fractions from flowers of *Cochlospermum vitifolium*. **South African Journal of Botany**, v. 148, p. 293-306, 2022.

SHARIFI-RAD, Mehdi *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 694, 2020.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

STEFANOWICZ-HAJDUK, Justyna *et al.* Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 732-740, 2020.

TAMOKOU, J. D. D.; MBAVENG, A. T.; KUETE, V. Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables. In: Medicinal spices and vegetables from Africa. **Academic Press**, v.2017. p. 207-237, 2017.

VICENTINI, Fernando Campanhã *et al.* Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag (I)

empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 34, p. 825-830, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os planejamentos fatoriais 2^4 e o design composto central demonstram ser uma ferramenta importante tanto na seleção de variáveis quanto na extração significativa de compostos fenólicos, com variação de 55,00 a 460,00 mg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto.
- As variáveis tempo de sonicação e concentração de *Kalanchoe crenata* apresentaram efeito positivo significativo na extração dos compostos fenólicos.
- Os compostos fenólicos extraídos de *Kalanchoe crenata* apresentaram atividade antioxidante e foram otimizadas ao empregar o planejamento de superfície resposta.
- Após a otimização observou-se variação de 538,33 a 1473,89 µg.EAG.mg⁻¹ do extrato bruto de compostos fenólicos.
- Os extratos obtidos apresentaram significativa atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.
- Observou-se que as maiores concentrações do extrato bruto apresentaram maior potencial de inibição. O extrato apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 2 mg.mL⁻¹ frente à *Escherichia coli*, com e potencial de inibição de 41,55%. Contra as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* observou-se inibição entre 49,31 - 73,19% e 10,64 - 49,60%, respectivamente, e CIM de 1 mg.mL⁻¹. *Bacillus cereus* não foi inibido pelo extrato hidroalcolico nas concentrações testadas.
- Observou-se que o extrato obtido de *Kalanchoe crenata* foi capaz de inibir o crescimento de *Candida tropicalis* com inibição entre 16,79 e 88,45% e de *C. fomata* com inibição de 22,85%.
- Os resultados deste estudo revelaram que os extratos de *Kalanchoe crenata* podem ser usados como uma fonte prontamente acessível de antioxidante naturais e, como tal, podem ser usados como matéria prima na indústria farmacêutica.