

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

DOI:10.34117/bjdv8n3-100

Recebimento dos originais: 14/02/2022

Aceitação para publicação: 09/03/2022

Gicélio Ramos da Silva

Bacharel em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Mato Grosso – Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Endereço: Av. Universitária, 1600-W, Parque das Emas, CEP: 78455-000

Lucas do Rio Verde - MT

E-mail: giceliorsilva@gmail.com

Akilla Justino da Silva Ribeiro

Técnica em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Mato Grosso – Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Endereço: Av. Universitária, 1600-W, Parque das Emas, CEP: 78455-000

Lucas do Rio Verde - MT

E-mail: akillajustinoribeiro@gmail.com

José Manoel da Silva Coutinho

Técnico em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Mato Grosso – Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Endereço: Av. Universitária, 1600-W, Parque das Emas, CEP: 78455-000

Lucas do Rio Verde - MT

E-mail: josem79.coutinho@gmail.com

Érica Luiz dos Santos

Doutora em Química

Instituição: Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Pontes e Lacerda

Endereço: Rodovia BR 174, KM 277, Zona Rural, CEP: 78250-000

Pontes e Lacerda - MT

E-mail: erica.luiz@unemat.br

Valéria de Souza Haragushiku

Doutora em Química

Instituição: Instituto Federal de Mato Grosso – Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Endereço: Av. Universitária, 1600-W, Parque das Emas, CEP: 78455-000

Lucas do Rio Verde - MT

E-mail: souza.haragushiku@ifmt.edu.br

RESUMO

A produção e estocagem do biodiesel requer cuidados específicos que visam garantir sua qualidade, sendo necessário o uso de antioxidantes para aumentar a estabilidade oxidativa. Em substituição as moléculas sintéticas que comumente são utilizadas para atender tal especificação, plantas com alto teor de antioxidantes tem sido alvo de estudos devido a sua menor toxicidade. O objetivo desse trabalho é avaliar e comparar a ação antioxidante das espécies *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier and *Kalanchoe laetivirens* quando aplicados no biodiesel. Os extratos brutos foram produzidos com as raízes e folhas secas e frescas utilizando etanol 70% (v/v) por maceração estática, Soxhlet e ultrassom. A determinação da umidade foi feita por gravimetria, a análise de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, a análise de atividade antioxidante pelo método de DPPH e a análise de estabilidade oxidativa a 110°C utilizando amostras de biodiesel aditivadas com 1000, 3000 e 5000 PPM dos extratos brutos. As espécies estudadas apresentaram um alto teor de umidade e alto rendimento nos extratos obtidos com material seco. Apresentaram compostos fenólicos que puderam promover a atividade antioxidante em ensaio com radical DPPH. Os extratos com maior ação antioxidante foram obtidos de *K. daigremontiana* utilizando Soxhlet e ultrassom na concentração de 5000 ppm, aumentando o tempo de indução do biodiesel de $8,72 \pm 0,11$ h para $11,70 \pm 0,04$ h e $11,39 \pm 0,07$ h respectivamente. Apesar de não se adequarem a exigência da ANP, ambas as espécies têm capacidade de atuar como fonte de antioxidantes naturais, considerando os ótimos resultados com extratos brutos.

Palavras-chave: aranto, antioxidantes naturais, fenóis, oxidação, rancimat.

ABSTRACT

The production and storage of biodiesel requires specific care to guarantee its quality, being necessary the use of antioxidants to increase the oxidative stability. In substitution to synthetic molecules that are commonly used to attend such specification, plants with high antioxidant content have been studied due the lower toxicity. The objective of this paper is to evaluate and compare the antioxidant action of the species *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier and *Kalanchoe laetivirens* applied in biodiesel. The crude extracts were produced with the roots and leaves dried and fresh leaves using 70% ethanol (v/v) by static maceration, Soxhlet and ultrasound. The determination of moisture was made by gravimetry, the analysis of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method, the analysis of antioxidant activity by the DPPH method and the analysis of oxidative stability at 110°C using biodiesel samples additived with 1000, 3000 and 5000 PPM of the raw extracts. The species studied showed a high moisture content and high yield in the extracts obtained with dried material. They presented phenolic compounds that could promote antioxidant activity in an assay with DPPH radical. The extracts with the highest antioxidant action were obtained from *K. daigremontiana* using Soxhlet and ultrasound at a concentration of 5000 ppm, increasing the biodiesel induction time from 8.72 ± 0.11 h to 11.70 ± 0.04 h and 11.39 ± 0.07 h, respectively. Despite not to reach the ANP requirement, both species have ability to act as a source of natural antioxidants, considering the excellent results with raw extracts.

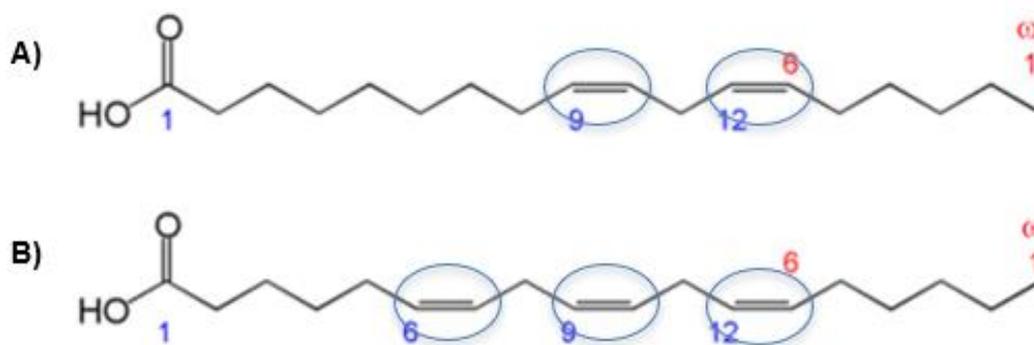
Keywords: aranto, natural antioxidants, phenols, oxidation, rancimat.

1 INTRODUÇÃO

Em 2005 o biodiesel começou a fazer parte da matriz energética Brasileira, compondo inicialmente 2% do óleo diesel comercial e sendo uma alternativa renovável ao uso do diesel fóssil. Derivado de lipídios vegetais e animais, o biodiesel é o produto principal da reação de transesterificação que ocorre entre triglicerídeos e álcool na presença de um catalisador, produzindo também a glicerina como subproduto (ANP, 2021). Durante o armazenamento desse biocombustível, condições como a luz, a temperatura, os metais e os radicais livres favorecem os processos oxidativos. A produção de moléculas como aldeídos, cetonas, ácidos, peróxidos e polímeros de massa superior durante a oxidação, interferem diretamente nas características químicas do combustível, e por fim, no desempenho dos motores de combustão (OLIVEIRA et al., 2012).

O oxigênio atmosférico reage com as duplas ligações dos ésteres, resultando na auto-oxidação. Isso está relacionado diretamente com os ácidos graxos insaturados presentes nos triglicerídeos, como exemplo dos ácidos linoléico e linolênico como mostrados na figura 1 a seguir, estão presentes no óleo de soja que é a principal matéria prima nacional (RAMOS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2012). Para minimizar essa degradação e aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel a 110°C para o mínimo de 12 horas, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabeleceu por meio da Resolução ANP N°798 de 01 de agosto de 2019 a obrigatoriedade do uso de um aditivo antioxidante (BRASIL, 2019).

Figura 1. Estrutura molecular dos ácidos graxos linoleico (A) e linolênico (B) com destaque para as insaturações



Fonte: OLIVEIRA et al. (2012)

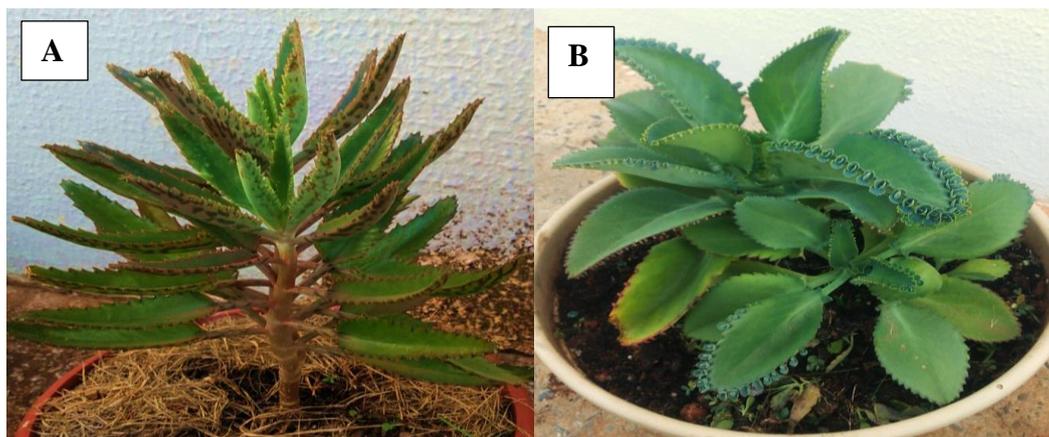
Os antioxidantes são definidos como moléculas naturais ou sintéticas que atuam inibindo ou retardando a oxidação de diferentes compostos, por meio do bloqueio das reações em cadeia. Os compostos fenólicos, a quinona, a lactona, os tocoferóis e entre muitos outros, são exemplos de moléculas orgânicas com a função de evitar a oxidação (CRUZ, 2014; RAMALHO et al.,

2006). As plantas produzem diversas dessas moléculas que atuam como antioxidantes, com o objetivo principal de combater a ação dos radicais livres (VIZOTTO et al., 2010). Esses antioxidantes naturais possuem grande potencial para aplicação na indústria de biodiesel, já que se faz necessário a substituição dos antioxidantes sintéticos, devido a sua toxicidade (GATO et al., 2016). Além de que por serem oriundos de fontes renováveis de fácil cultivo, podem reduzir o custo do produto final.

Os antioxidantes sintéticos como o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol), o BHT (2,6-diterc-butil-p-creso), o PG (galato de propila) e o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) são amplamente utilizados nas indústrias, sendo este último classificado como o melhor para óleos e gorduras (FOOD INGREDIENTS BRASIL, pg.18, 2009). Segundo Takemoto (2005), há estudos que mostram possíveis efeitos toxicológicos, como indução de tumores, retardo no crescimento, hiperplasia no estômago e anemia, sendo o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) um potencial mutagênico em alguns ensaios realizados.

A espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier, mostrada na figura 2 a seguir, faz parte da família Crassulaceae e é popularmente conhecida como Aranto ou Mãe-de-milhares. É uma espécie nativa do continente africano, mas pode ser encontrada nas regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta (UDI, 2016). Sendo alvo de estudos, apresentou atividade antioxidante nos extratos das raízes (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016), das folhas (RASHID et al., 2013; BOGUCKA-KOCKA et al., 2018; ZAWIRSKA-WOJTASIAK et al., 2019) e das flores (PUERTAS MEJÍA et al., 2014), além da presença de vitamina C (ZAWIRSKA-WOJTASIAK et al., 2019) e de fenóis (RASHID et al., 2013).

Em *K. daigremontiana* foi identificado a presença dos glicosídeos cardiotônicos como os bufadienólidos (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016) que podem ser encontradas em outras espécies desse gênero e que possuem uma certa toxicidade (LOZANO-MILO et al., 2020), sendo necessário uma atenção quanto ao consumo direto desses vegetais. O gênero *Kalanchoe* abriga diversas espécies com potencial anti-inflamatório e para tratar infecções. A espécie *Kalanchoe laetivirens*, também exibida na figura 2 a seguir, tem demonstrado ação anticancerígena no extrato das folhas (KAEWPIBOON et al., 2014) e a presença de fenóis e flavonoides (PINHEIRO et al., 2020).

Figura 2. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (A) e *Kalanchoe laetivirens* (B)

Fonte: Autores

Mesmo com poucos estudos disponíveis na literatura, *K. laetivirens* desperta um grande interesse, assim como *K. daigremontiana* na área farmacêutica e principalmente na área industrial (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016; BOGUCKA-KOCKA et al., 2018; PUERTAS MEJÍA et al., 2014; KAEWPIBOON et al., 2014). Desse modo, este trabalho tem como objetivo comparar a ação antioxidante dos extratos brutos hidroetanólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens*, além de determinar o método de extração com maior rendimento e avaliar a capacidade dos extratos retardarem da oxidação do biodiesel.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada em agosto de 2021 no município de Lucas do Rio Verde/MT, localizado a uma altitude de 390 metros sob o nível do mar, nas coordenadas geográficas S 13°06'13,0'' W 55°54'10,9''. As espécies *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens* foram comparadas morfológicamente com trabalho realizado por Madariaga-Navarrete et al., (2021), Alves (2019) e com as exsiccatas MBM302738 e MBM331500 do acervo digital do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba. As espécies coletadas não apresentavam partes férteis como as flores, o que inviabilizou a produção de exsiccatas e depósito em herbário.

O material vegetal foi higienizado com água para retirar o resíduo de solo e separou-se as folhas e as raízes, dividindo em material fresco e material para secagem. A secagem foi realizada em estufa a 40°C por 15 dias, e o material a ser usado fresco foi enviado diretamente para a produção dos extratos.

2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

Foi empregado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019), no qual pesou-se 2g da amostra fresca das folhas e das raízes trituradas. O material fresco foi submetido a secagem em cápsulas de porcelana, em estufa a 105°C por 5 horas, e foi realizado novas pesagens até que atingisse a constância do peso. O percentual de umidade foi expresso pela fórmula: %UMIDADE= (massa fresca – massa seca) / massa fresca x 100.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS POR MACERAÇÃO ESTÁTICA (EMD e EML)

As folhas frescas, devidamente lavadas, foram trituradas mecanicamente utilizando processador elétrico de alimentos, e submetidas a maceração estática. Utilizou-se o etanol 70% (v/v) como solvente, na proporção de 1:1 (m/v) por 7 dias em temperatura ambiente (25°C). O conteúdo foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 70°C e seco posteriormente em estufa a 40°C até a eliminação completa do solvente. Os extratos secos de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (EMD) e *K. laetivirens* (EML) foram armazenados em ambiente refrigerado (3°C) e livre de luz e umidade, até a execução das análises.

2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS POR EXTRAÇÃO EM SOHXLET (ESD e ESL)

O material seco constituído por folhas e raízes de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (ESD) e *K. laetivirens* (ESL), foi triturado mecanicamente fazendo uso de processador elétrico de alimentos, sendo posteriormente submetidos a extração em aparelho Soxhlet. Utilizou-se etanol 70% (v/v) na proporção de 1:16 (m/v). Os dois extratos obtidos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador a 70°C, sendo secados em estufa até a completa eliminação do solvente residual. O armazenamento foi realizado em ambiente refrigerado (3°C) e livre de luz e umidade, até a realização das análises.

2.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS POR BANHO ULTRASSÔNICO (EUD e EUL)

As folhas e as raízes das plantas foram mecanicamente trituradas por processador elétrico de alimentos, sendo submetidas a extração por 90 minutos com etanol 70% (v/v) na proporção de 1:5 (m/v). A extração ocorreu em banho ultrassônico da marca SolidSteel modelo SSBu com temperatura controlada de 25°C, frequência ultrassônica de 40 KHz e 160 watts de potência. Os extratos obtidos de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (EUD) e *K. laetivirens* (EUL) foram filtrados e concentrados em rotaevaporador a 70°C, sendo secos em estufa a 40°C para eliminação completa do solvente e armazenados em seguida em ambiente refrigerado (3°C) e livre de luz e umidade.

Todos os extratos secos foram diluídos em etanol 70% (v/v) para a realização dos ensaios. Tais extratos fluidos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração (3°C) até a realização das análises.

2.6 ANÁLISE DE CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (DIAS, 2016), em que uma alíquota de 0,25 mL de cada extrato diluído (100-1000 µg/mL) foi transferida para tubos de ensaio com 2,75 mL da solução de 3% do reagente Folin-Ciocalteu. Agitou-se por 10 segundos em vórtex e realizou-se um repouso de 5 minutos. Após o tempo decorrido, inseriu-se 0,25 mL da solução de Carbonato de sódio 10%, agitou-se em vórtex por 10 segundos e submeteu-se a repouso de 60 minutos na ausência de luminosidade. A leitura ocorreu em espectrofotômetro digital de duplo feixe UV-Vis da marca Kasuaki modelo IL-0082-BI, em um comprimento de onda de 765 nm, utilizando Etanol 70% (v/v) P.A como branco.

Foi produzido uma curva padrão utilizando ácido gálico nas concentrações de 0,5-100 mg/L. Os dados obtidos na análise foram expressos em mg equivalente a ácido gálico/g de extrato seco, através da equação da reta: $y=0,0049 x - 0,0088$, com $R^2= 0,9986$.

2.7 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foi utilizado o método de captura do radical 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) descrito por Rashid et al. (2013) com modificações. Deste modo, em tubos de ensaio, uma alíquota de 2,0 mL da solução de DPPH em etanol 95% (v/v) P.A (32 µg/mL) foi misturada com 2,0 mL dos extratos diluídos nas concentrações de 25-200 µg/mL em etanol 70% (v/v) P.A. Os tubos foram agitados em vórtex e repousaram por 30 minutos em ambiente sem luz. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro digital de duplo feixe UV-Vis da marca Kasuaki modelo IL-0082-BI, em um comprimento de onda de 517 nm, utilizando etanol 95% (v/v) P.A como branco.

Utilizou-se um controle negativo composto da solução de DPPH e etanol 70% (v/v) P.A em substituição dos extratos. Foi utilizado um controle para cada diluição dos extratos, substituindo o DPPH por etanol 95% (v/v) P.A com o objetivo de diminuir o erro ocasionado pelos pigmentos das amostras. O percentual de atividade antioxidante (%AA) foi calculado pela fórmula: $\%AA = (Absorbância\ controle - Absorbância\ amostra) \times 100 / Absorbância\ controles$.

Foi produzido um gráfico de regressão linear para cada extrato onde x=concentração e y= percentual de atividade antioxidante. O cálculo de EC₅₀ foi determinado por meio da substituição

do y na equação da reta de cada extrato, pelo valor de 50, onde se obteve a concentração de extrato que reduziu 50% da concentração do radical DPPH.

2.8 ANÁLISE DE ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL

O biodiesel utilizado foi produzido por processo industrial na Fábrica de Biodiesel Fiagril LTDA, localizada no município de Lucas do Rio Verde – MT, sendo fornecido gentilmente para a análise. A transesterificação seguiu-se com Metanol e utilizou o Metóxido de sódio como catalisador. A matéria prima empregada foi oriunda de blend, constituído de óleo de soja (70%) e óleo de milho (30%). Amostras de 20g de biodiesel foram aditivadas com os extratos nas concentrações de 1000, 3000 e 5000 ppm, sendo realizada a agitação após a mistura em equipamento vórtex.

A análise ocorreu logo após a aditivação sendo determinada como descrito na norma oficial EN 14112, fazendo uso do equipamento Rancimat modelo 873 da marca Metrohm, com auxílio do Software Metrodata 873 Biodiesel Rancimat Software 1.1, aplicando 3 g de biodiesel por amostra para determinação do Tempo de Indução a uma temperatura de 110°C.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos são correspondentes a média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido de Teste Tukey com 5% de significância, utilizando o software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A polaridade dos solventes pode otimizar ou dificultar a extração, de acordo com o teor de água presente na amostra (SOUZA, 2019). O Etanol 70% (v/v) favoreceu as extrações, e ainda pode-se melhorar o desempenho fazendo uso dos diferentes métodos extrativos.

O teor de umidade das plantas demonstrou ser um fator que refletiu no rendimento dos extratos, como pode ser observado na Tabela 1. Apesar das folhas não diferirem estatisticamente, apresentaram um alto teor de água, próximo de 95%. As raízes apresentaram umidade relativamente maior em *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (86,03 \pm 0,53%) quando comparada com *K. laetivirens* (82,19 \pm 1,20%).

Tabela 1. Teor de umidade das folhas e das raízes das espécies *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens*

Espécie	Parte isolada da planta	Umidade (%)
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier	Folhas	95,05 ± 0,19 ^C
	Raízes	86,03 ± 0,53 ^B
<i>Kalanchoe laetivirens</i>	Folhas	95,26 ± 0,02 ^C
	Raízes	82,19 ± 1,20 ^A

As letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística a 5% de significância

Segundo Souza (2019), a umidade elevada deve ser levada em consideração durante o processo de secagem das plantas. A contaminação do material por fungos resulta na degradação dos compostos bioativos, além de ocorrer a produção de moléculas indesejadas, ou até mesmo tóxicas, e prejudicar a extração.

Os rendimentos dos extratos foram superiores aos encontrados na literatura, descritos por Puertas Mejía et al. (2014) que obteve 1,48% e Kolodziejczyk-Czepas et al. (2016) com 6,96%, já que diferiram entre os métodos de extração e o material vegetal utilizado. A espécie *Kalanchoe laetivirens* apresentou um rendimento maior nas extrações com material seco, sendo 31,64% por Soxhlet e 17,24% por ultrassom. Para a espécie *Kalanchoe daigremontiana*, a extração por Soxhlet rendeu 16,56% e a extração por ultrassom 9,68%. Esses dados diferem com os obtidos na maceração, já que *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier obteve maior rendimento (3%) quando comparada com *K. laetivirens* (1,90%).

Os compostos fenólicos são oriundos majoritariamente da via do ácido chiquímico, podendo ser caracterizados por moléculas que possuem no mínimo um anel aromático, em que, pelo menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. Essas moléculas conferem características sensoriais às plantas, como cor e aroma, além de serem antioxidantes importantes, impedindo a ação dos radicais livres (VIZZOTO et al., 2010). Na Tabela 2 a seguir, é possível comparar o rendimento e o teor de compostos fenólicos de cada extrato.

Tabela 2. Comparação dos métodos de extração em relação ao percentual de rendimento e o conteúdo fenólico total dos extratos

Extratos	Rendimentos dos extratos	Conteúdo fenólico total (mgEqAG/g extrato seco)
EMD	3,00%	28,50 ± 0,96 ^B
EML	1,90%	20,14 ± 1,26 ^A
ESD	16,56%	71,22 ± 1,33 ^C
ESL	31,64%	70,81 ± 0,70 ^C
EUD	9,68%	74,91 ± 1,37 ^D
EUL	17,24%	79,57 ± 1,93 ^E

Legenda: EMD) Extrato por maceração de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EML) Extrato por maceração de *K. laetivirens*; ESD) Extrato por Soxhlet de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; ESL) Extrato por Soxhlet de *K. laetivirens*; EUD) Extrato por ultrassom de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EUL) Extrato por ultrassom de *K. laetivirens*; EqAG) Equivalentes a Ácido gálico. As letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença a 5% de significância

Nos extratos obtidos por maceração estática a espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier apresentou um conteúdo fenólico de $28,50 \pm 0,965$ mg EqAG/g, sendo superior a espécie *Kalanchoe laetivirens* ($20,14 \pm 1,256$ mg EqAG/g). Tais resultados se assemelham aos estudos realizados por Jaiswal et al. (2014) em *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., que obteve um teor de $28,4 \pm 2$ µgEqQuercetina/mg de extrato. Tal método de extração obteve os menores teores quando comparados com os demais métodos, podendo estar relacionado com a presença de água no material vegetal.

As extrações por ultrassom mostraram-se mais eficientes quando se busca obter altos teores de conteúdo fenólico, além de ocorrer em menos tempo e sem necessidade de aquecimento. *K. laetivirens* sobressaiu-se apresentando $79,57 \pm 1,935$ mg EqAG/g de extrato, e *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier apresentou $74,91 \pm 1,367$ mg EqAG/g de extrato. Segundo Schons et al. (2017), a extração por ultrassom favorece a obtenção das substâncias intracelulares, por meio da extrusão dos tecidos vegetais ocasionada pela intensidade das ondas ultrassônicas.

As extrações por Soxhlet apresentaram resultados que não diferiram estatisticamente entre *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier ($71,22 \pm 1,334$) e *K. laetivirens* ($70,81 \pm 0,698$). Possivelmente a temperatura elevada e o tempo que foi submetida a extração por Soxhlet, pode ter sido um fator de degradação desses compostos, apresentando uma menor concentração. Resultado ainda maior foi descrito por Pinheiro et al. (2020), em *K. laetivirens*, que obteve $166,66 \pm 0,8$ mgEqAG/g de extrato, fazendo uso da maceração estática e etanol 96% (v/v) como solvente.

Os flavonóides, juntamente com os ácidos fenólicos, estão presentes nas plantas do gênero *Kalanchoe* como compostos fenólicos (LOZANO-MILO et al., 2020). A produção desses flavonóides podem ser influenciadas pela luz solar, em que as plantas cultivadas sob luz solar direta apresentam um maior teor desses compostos, já que estes são responsáveis pela proteção da radiação e da formação dos compostos reativos de oxigênio (PINHEIRO, 2017). Este pode ser um dos motivos da grande variação nas concentrações apresentadas na literatura, com os resultados obtidos neste trabalho, além do estresse hídrico que também influencia no desenvolvimento das plantas.

A atividade antioxidante de vegetais é comumente confirmada pelo método DPPH, onde o extrato reduz o radical através de uma reação de oxirredução. As moléculas antioxidantes transferem um elétron para o radical, impedindo que ele oxide outros compostos disponíveis (PIRES et al., 2017), sendo perceptível pela mudança da coloração roxo para o amarelo. Na tabela 3 a seguir, é possível observar a ação de cada extrato conforme a sua concentração, atuando como antioxidantes do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Tabela 3. Atividade redutora dos extratos de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *K. laetivirens* em radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) *in vitro*, com os respectivos valores de EC₅₀

Dose dos extratos (µg/mL)	% de redução do radical DPPH em cada extrato					
	EMD	EML	ESD	ESL	EUD	EUL
25	10,81 ± 1,05	5,47 ± 0,43	19,90 ± 0,28	17,73 ± 0,18	18,03 ± 0,18	13,70 ± 0,72
50	21,52 ± 0,14	5,57 ± 0,32	37,21 ± 0,59	27,06 ± 0,76	31,08 ± 0,26	23,77 ± 0,84
75	29,30 ± 1,16	6,94 ± 0,42	53,75 ± 1,09	36,39 ± 0,47	44,41 ± 0,81	31,27 ± 0,47
100	33,49 ± 1,06	7,30 ± 0,55	65,37 ± 0,26	41,60 ± 0,59	56,99 ± 0,84	35,40 ± 1,13
125	42,45 ± 0,29	8,89 ± 1,17	71,58 ± 0,29	55,55 ± 0,25	68,17 ± 0,46	45,74 ± 0,79
150	52,87 ± 0,77	10,46 ± 0,56	79,33 ± 0,25	61,76 ± 0,13	78,77 ± 1,29	50,90 ± 1,15
175	58,62 ± 0,22	11,73 ± 0,53	89,66 ± 1,09	64,20 ± 1,49	86,10 ± 0,49	57,11 ± 1,62
200	66,89 ± 0,55	12,22 ± 0,40	93,02 ± 0,68	72,94 ± 0,50	94,83 ± 0,19	60,72 ± 0,08
EC₅₀ (µg/mL)	145,75 ± 1,38^D	>200^F	68,01 ± 0,56^A	120,56 ± 0,54^C	88,06 ± 0,93^B	150,04 ± 1,01^E

Legenda: EMD) Extrato por maceração de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EML) Extrato por maceração de *K. laetivirens*; ESD) Extrato por Soxhlet de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; ESL) Extrato por Soxhlet de *K. laetivirens*; EUD) Extrato por ultrassom de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EUL) Extrato por ultrassom de *K. laetivirens*; EC₅₀) Concentração do extrato que reduz 50% da concentração do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. As letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística a 5% de significância

Os dados de cada extrato foram inseridos em um gráfico de dose-resposta, com o objetivo de determinar o percentual de 50%, em que se refere a concentração do extrato que reduziu a metade da concentração do radical DPPH (EC₅₀). O valor de EC₅₀ representa uma maior efetividade do extrato quanto menor for a sua concentração, sendo possível reduzir a oxidação com menos conteúdo da planta. Percebeu-se que conforme houve o aumento da concentração dos extratos, a redução do radical livre também foi aumentando, demonstrando a eficácia dos antioxidantes presentes nas amostras.

Os extratos obtidos por Soxhlet desempenharam os melhores resultados, sendo *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier com EC₅₀ de 68,01 ± 0,56 µg/mL e *K. laetivirens* com EC₅₀ de 120,56 ± 0,54 µg/mL. Em sequência, a extração por ultrassom evidenciou a efetividade da espécie *K. daigremontiana*, apresentando EC₅₀ de 88,06 ± 0,93 µg/mL enquanto *K. laetivirens* mostrou-se com EC₅₀ de 150,04 ± 1,01 µg/mL. Os dados obtidos com os extratos por maceração estática foram inferiores, podendo ser relacionados ao conteúdo de compostos fenólicos baixos. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier ainda sim mostrou-se superior, constituindo EC₅₀ de 145,75 ± 1,38 µg/mL, já que não foi possível estimar a concentração de

Kalanchoe laetivirens, devido o percentual máximo obtido ter sido o menor, sendo necessário atribuir o valor de $>200 \mu\text{g/mL}$.

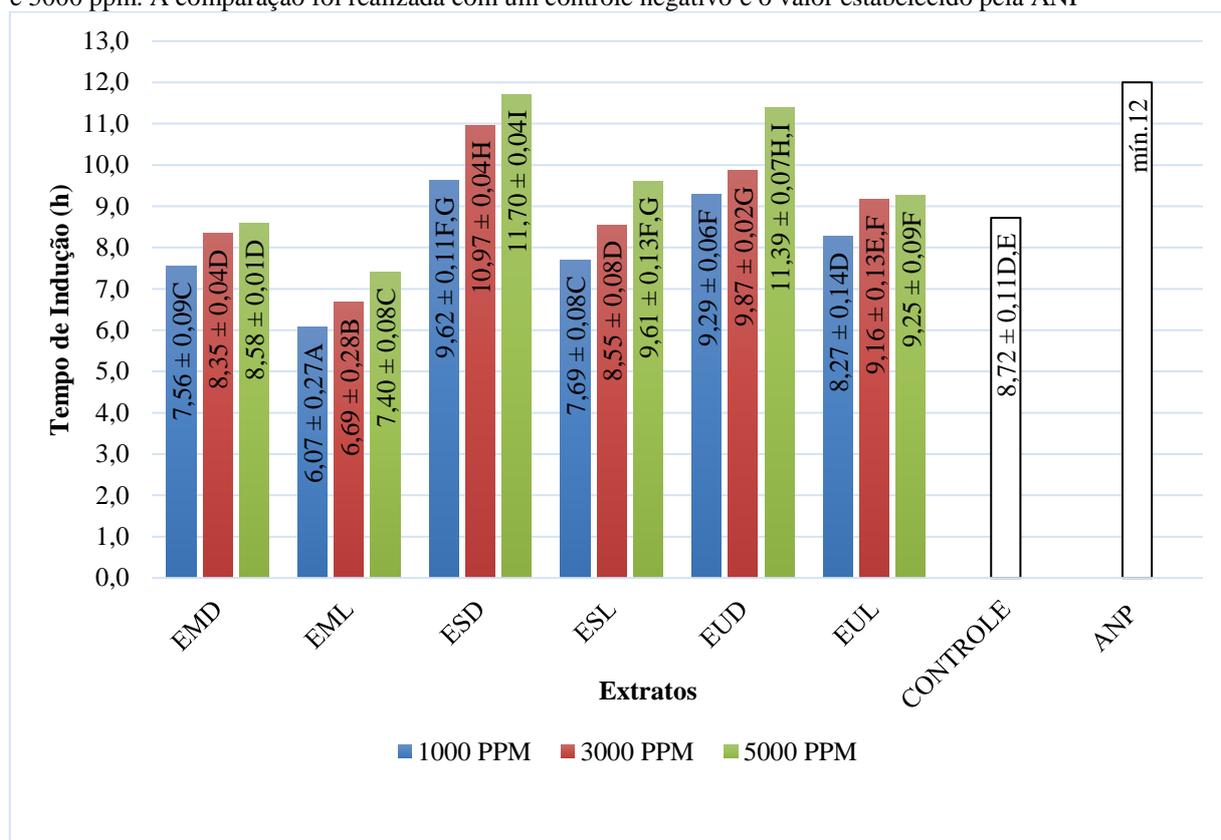
Estudos realizados por Bogucka-Kocka et al. (2018), com as folhas frescas de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier, foi possível obter EC_{50} de $1457 \pm 8 \mu\text{g/mL}$ em extração acelerada por solvente e $180 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ na maceração. Resultados menores foram também descritos por Rashid et al. (2013) em maceração, porém com as folhas secas de *K. daigremontiana*, obtendo EC_{50} de $145 \mu\text{g/mL}$ utilizando metanol acidificado como solvente.

Segundo Silva et al (2010) a atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a proximidade das hidroxilas ao grupo fenil. Os ácidos cafeico, cumárico, ferúlico, protocatecuico e vanílico são exemplos de moléculas com alta capacidade antioxidante. Ainda, Bogucka-Kocka et al (2018) descreve a presença dos ácidos ferúlico, cafeico, serínico e protocatecuico em *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier. Tais moléculas podem ser as responsáveis pela melhor atividade antioxidante nos extratos dessa espécie. Desse modo, pode-se entender que mesmo a espécie *K. laetivirens* ter superado na concentração de compostos fenólicos, não foi possível obter os melhores resultados quanto a sua atividade antioxidante.

Os pigmentos presentes nos extratos brutos, em maior parte as clorofilas, conferiram uma mudança visual na coloração das amostras aditivadas, se tornando mais forte conforme aumentava-se a concentração. Segundo Castelo-Branco et al (2011), esses pigmentos podem atuar como antioxidantes primários, mas que se forem expostos a luminosidade podem ser capazes de facilitar a oxidação, atuando como pró-oxidantes em baixas concentrações.

Quando submetidos a aditivação no biodiesel, os resultados demonstraram uma correlação positiva com os dados de EC_{50} , já que os extratos com menor valor de EC_{50} agregaram um maior tempo de indução nas amostras. O gráfico 1 a seguir exibe a estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel aditivadas com os diferentes tipos de extratos e suas respectivas concentrações.

Gráfico 1. Tempo de Indução das amostras de biodiesel aditivado com cada extrato nas concentrações de 1000, 3000 e 5000 ppm. A comparação foi realizada com um controle negativo e o valor estabelecido pela ANP



Legenda: EMD) Extrato por maceração de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EML) Extrato por maceração de *K. laetivirens*; ESD) Extrato por Soxhlet de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; ESL) Extrato por Soxhlet de *K. laetivirens*; EUD) Extrato por ultrassom de *K. daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier; EUL) Extrato por ultrassom de *K. laetivirens*. CONTROLE) Biodiesel puro sem aditivos; ANP) Limite mínimo exigido pelo órgão Nacional (12 h). As letras iguais entre as colunas não apresentam diferença estatística a 5% de significância

As adituações realizadas com os extratos obtidos por maceração estática foram as que mais se distanciaram das demais e do controle estudado. A espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier garantiu o tempo de indução máximo em 5000 ppm com $8,58 \pm 0,01$ h, além de $7,56 \pm 0,09$ h em 1000 ppm e $8,35 \pm 0,04$ h ao aplicar 3000 ppm. A espécie *Kalanchoe laetivirens* se mostrou ainda inferior, com $6,07 \pm 0,27$ h (1000 ppm), $6,69 \pm 0,28$ h (3000 ppm) e $7,40 \pm 0,08$ h (5000 ppm). Notou-se que os extratos atuaram como pro-oxidantes nas concentrações aplicadas podendo estarem relacionados também ao teor baixo de compostos fenólicos.

O período de indução nas ativações com os extratos obtidos por Soxhlet foram superiores a maceração estática. A espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier obteve $9,62 \pm 0,11$ h (1000 ppm), $10,97 \pm 0,04$ h (3000 ppm) e $11,70 \pm 0,04$ h (5000 ppm). Já a espécie *Kalanchoe laetivirens* mostrou-se inferior quando comparada, obtendo $7,69 \pm 0,08$ h (1000 ppm), $8,55 \pm 0,08$ h (3000 ppm) e $9,61 \pm 0,13$ h (5000 ppm). Este método de extração se mostrou muito

positivo, sendo que quatro das concentrações revelaram-se superiores ao controle ($8,72 \pm 0,11$ h).

As extrações por ultrassom confirmaram que a espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier superou a espécie *Kalanchoe laetivirens* em todos os métodos extrativos realizados. *K. daigremontiana* revelou nas aditivações com 1000 ppm, 3000 ppm e 5000 ppm os tempos de indução de $9,29 \pm 0,06$ horas, $9,87 \pm 0,02$ horas e $11,39 \pm 0,07$ horas, respectivamente. Com isso, com o extrato de *K. laetivirens* nas mesmas concentrações de aditivação, mostrou um tempo de indução de $8,27 \pm 0,14$ horas, $9,16 \pm 0,13$ horas e $9,25 \pm 0,09$ horas na mesma ordem. Apenas uma das concentrações mostrou-se estatisticamente igual ao controle.

Diante dos resultados expostos, os extratos ESD e EUD em suas concentrações máximas demonstraram a melhor efetividade na estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel. Deve-se considerar que se fez uso de extratos brutos, havendo muitos compostos que não possuem atividade antioxidante. As aditivações agregaram um tempo maior que a amostra controle, além de ficarem muito próximo do valor mínimo estabelecido pela ANP, que é de 12 horas.

4 CONCLUSÃO

A presença dos compostos fenólicos em extratos vegetais pode ser um indicativo de ação antioxidante, entretanto não deve ser interpretada como fator principal de uma boa ação, tendo em vista a grande variedade dessas moléculas e as diferentes capacidades de atividade contra os radicais livres. É necessário a complementação com a análise de inibição de radicais, sendo o DPPH um método eficiente.

A espécie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier desempenhou melhor o papel de potencial antioxidante frente a espécie *Kalanchoe laetivirens*. Apesar de serem plantas do mesmo gênero e o cultivo ter sido realizado sob as mesmas condições, as espécies produzem compostos diferentes de acordo com as suas necessidades e tolerância ao estresse. Nota-se, porém, que ambas as espécies têm potencial de serem utilizadas como produtoras de aditivo antioxidante para biodiesel devido a capacidade de melhorar a estabilidade oxidativa.

Conclui-se que os estudos executados neste trabalho deverão conduzir pesquisas posteriores, relacionados a purificação dos extratos brutos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens*. O isolamento de frações purificadas a partir dos extratos iniciais permitirá uma maior eficiência utilizando concentrações menores. Faz-se necessário também estudos relacionados a estabilização desses extratos, avaliando o tempo em que se mantém com ação depois de serem aditivados no biodiesel.

REFERÊNCIAS

ALVES, K. C. H; POVH, J. A; PORTUGUEZ, A. P. Etnobotânica de plantas ritualísticas na prática religiosa de matriz africana no município de Ituiutaba, Minas Gerais. **Ethnoscintia: Revista Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia**, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/ethnoscintia/article/view/10258>. Acesso em 05 jan. 2022.

ANP (Brasil). AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Especificação do Biodiesel. Publicado em 13/07/2020, atualizado em 22/12/2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/biodiesel/especificacao-do-biodiesel>. Acesso em 05 jan. 2022.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução nº 798 de 1 de agosto de 2019**. Altera a Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014, que estabelece as especificações de qualidade de biodiesel. Brasília, DF: Ministério de Minas e Energia, 02 de agosto de 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-798-de-1-de-agosto-de-2019-208544998>. Acesso em 05 jan. 2022.

ANVISA (Brasil). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em 05 jan. 2022.

BOGUCA-KOCKA, A. et al. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four Kalanchoë species. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 622-630, 2018. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16000395>. Acesso em 05 jan. 2022.

CASTELO-BRANCO, V. N; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição [online]**. 2011, v. 24, n. 1, pp. 173-187 ISSN 1678-9865. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000100017>. Acesso em 05 jan. 2022.

CRUZ, R. G. D. Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico. 2014. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-11082014-170401/publico/Richtier_Goncalves_da_Cruz.pdf. Acesso em 05 jan. 2022.

DIAS, T. Protocolo de determinação do teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) – Espectrofotometria. Laboratório De Nutrição E Análise De Alimentos. Faculdade de Nutrição – UFGO. 2016. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/128/o/Fen%C3%B3licos_Totais_-_LANAL-UFG._Vers%C3%A3o_2.pdf?1545409339. Acesso em 05 jan. 2022.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira De Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>. Acesso em 05 jan. 2022.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê: antioxidantes. **Revista Food Ingredients Brasil**, n°6, 2009. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/edicoes/6/guia-de-fornecedores-2009>. Acesso em 10 dez. 2021.

GATO, F. S. et al. **Avaliação de antioxidantes naturais e sintéticos na estabilidade oxidativa de biodiesel de macaúba (*Acrocomia Aculeata*)**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19271>. Acesso em 05 jan. 2022.

JAISWAL, S.; CHAWLA, R.; SAWHNEY, S. Kalanchoe pinnata - a Promising Source of Natural Antioxidants. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 10, p. 1210-1222, 3 jul. 2014. Disponível em: <https://www.journalejmp.com/index.php/EJMP/article/view/14485>. Acesso em: 05 jan. 2022.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Antioxidant efficacy of Kalanchoe daigremontiana bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3182-3188, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2016.1214740>. Acesso em: 05 jan. 2022.

KAEWPIBOON, C. et al. Extract of Bryophyllum laetivirens reverses etoposide resistance in human lung A549 cancer cells by downregulation of NF- κ B. **Oncology reports**, v. 31, n. 1, p. 161-168, 2014. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2844?text=abstract>. Acesso em 05 jan. 2022.

LOZANO-MILO, E; GARCÍA-PÉREZ, P; GALLEGO, P. P. Narrative review of production of antioxidants and anticancer compounds from Bryophyllum spp.(Kalanchoe) using plant cell tissue culture. **Longhua Chin. Med.**, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/2750/0f3cd9bf375b97dc021ade4d72848f1a22f8.pdf>. Acesso em 05 jan. 2022.

MADARIAGA-NAVARRETE, A. 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. Disponível em: <https://www.ijper.org/sites/default/files/IndJPhaEdRes-55-2-445.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2022.

OLIVEIRA, R. S. Avaliação da ação antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (Glycine max). 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/1806>. Acesso em 05 jan. 2022.

PINHEIRO, N. A. P. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de *Bryophyllum laetivirens* (desc.) Vv byalt. **Revista Coleta Científica**, v. 4, n. 7, p. 11-17, 2020. Disponível em: <http://portalcoleta.com.br/index.php/rcc/article/view/6>. Acesso em: 05 jan. 2022.

PINHEIRO, H. S. et al. Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 404-416, maio 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19271>. Acesso em: 05 jan. 2022.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 6, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324452930_Ensaio_em_microplaca_do_potencial_antioxidante_atraves_do_sistema_quelante_de_metais_para_extratos_de_algas. Acesso em: 05 jan. 2022.

PUERTAS MEJIA, M. A; TOBON GALLEGO, J; ARANGO, V. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana, v. 19, n. 1, p. 61-68, março 2014. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000100008&lng=es&nrm=iso. Acesso em 05 jan. 2022.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, Julho, 2006. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 05 jan. 2022.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição nº**, v. 31, p. 29, 2003. Disponível em: http://www.geocities.ws/bueno_reis/biodiesel.pdf. Acesso em: 05 jan. 2022.

RASHID, M. A. et al. Phytochemical and Pharmacological Studies of *Bryophyllum Daigremontianum* (Raym.). **American Journal of PharmTech Research** 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Haque-6/publication/273439032_Phytochemical_and_Pharmacological_Studies_of_Bryophyllum_daigremontianum_Raym/links/55007a060cf2aee14b54a381/Phytochemical-and-Pharmacological-Studies-of-Bryophyllum-daigremontianum-Raym.pdf. Acesso em 05 jan. 2022.

SCHONS, J. I. et al. Extração assistida por ultrassom e caracterização do óleo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK). **Interciencia**, v. 42, n. 9, p. 586-590, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/339/33952909006/html/>. Acesso em 07 jan. 2022.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744097017.pdf>. Acesso em 05 jan. 2022.

SOUSA, D. M. D. **Avaliação de extratos naturais na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel e antimicrobiana na fermentação alcoólica**. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/4536>. Acesso em 05 jan. 2022.

TAKEMOTO, E. **Determinação simultânea de antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por cromatografia líquida de alta eficiência** / Emy Takemoto. – Campinas, SP: [s.n.], 2005. Disponível em: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1329020>. Acesso em 12 dez. 2021.

VIZZOTO, M. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância / Marcia Vizzoto, Ana Cristina Krolow e Gisele Eva Bruch Weber – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>. Acesso em 05 jan. 2022.

UDI, M. M. **Hongos y plantas de interés medicinal en la Selva de Irati (Navarra). Ensayos de citotoxicidad del hongo obtenido de la Selva de Irati y comparación con tres plantas comerciales utilizadas en el tratamiento del cáncer.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais) Mestrado em cooperação com a Universidade de Salamanca. 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/13661>. Acesso em 05 jan. 2022.

ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. et al. Vitamin C and aroma composition of fresh leaves from *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56359-1>. Acesso em 05 jan. 2022.