

Avaliação de metodologia analítica espectrofotométrica para quantificação de flavonoides totais nas folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae)

Evaluation of analytical method by spectrophotometry for quantification of total flavonoids from leaves of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae)

Livia Lopes Matos¹, Júlia Morais Fernandes¹, Magda Rhayanny Assunção Ferreira¹, Silvana Maria Zucolotto Langassner¹, Luiz Alberto Lira Soares^{1*}

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pernambuco

*Correspondência:
E-mail: lals.ufpe@gmail.com

RESUMO

O principal propósito deste trabalho foi avaliar e validar uma metodologia analítica por espectrofotometria para doseamento de flavonoides totais das folhas de *Kalanchoe brasiliensis*. Para tanto, a extração foi conduzida por turbólise das folhas frescas na proporção de 1:1 (m/v) empregando etanol 50% (v/v) como solvente. O tempo de reação e a concentração de AlCl_3 foram estabelecidos após execução de um desenho composto central (DCC) adotando como níveis as faixas de 10,86 à 39,14 min e de 1,46 à 8,54% (m/v), respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e a absorvância foi a variável de resposta. O comprimento de onda para leitura foi de 412 nm, estabelecido após varredura da solução do complexo AlCl_3 -flavonoides. Os resultados do DCC foram usados para gerar superfície de resposta, que revelou como condição ótima para realização do ensaio: AlCl_3 5% (m/v) após 15 minutos de reação. O método analítico apresentou linearidade ($R^2 = 0,9988$), precisão ($\text{CV}\% \leq 5\%$) e robustez ($\text{CV}\% \leq 5\%$) para os parâmetros investigados.

Palavras-chave: *Kalanche brasiliensis*; Flavonóides Totais; Espectrofotometria; Validação.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to evaluate and validate a spectrophotometric assay for determination of total flavonoids content in the leaves from *Kalanchoe brasiliensis*. The extractives were prepared by turboextraction of fresh herbal drug at proportion of 1:1 (w/v) using ethanol 50% (v/v) as solvent. The reactional time and AlCl_3 concentration were proposed after analysis by using a central composite design (CCD) at levels ranged from 10.86 à 39.14 min and from 1.46 to 8.54% (w/v), respectively. The experiments were performed in triplicate and the absorbance was the response. The wavelength for analysis was 412 nm and it was established from UV-Vis spectrum of AlCl_3 -flavonoid complex. The data from the CCD were used to generate a response surface, which revealed optimum operational condition for the assay at AlCl_3 at 5.0 % (w/v) after 15 min of reaction. The analytical method showed linearity ($R^2 = 0.9988$), precision ($\text{CV}\% \leq 5\%$) and robustness ($\text{CV}\% \leq 5\%$) for all parameters investigated.

Keywords: *Kalanche brasiliensis*; Total Flavonoid Content; Spectrophotometry; Validation.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies do gênero *Kalanchoe*, pertencente à família Crassulaceae, a espécie *Kalanchoe brasiliensis* Cambess, originária do Brasil, apresenta amplo e difundido uso na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios entre os quais podem ser destacadas artrite e dispepsia (TREVISAN et al., 2006, LORENZI & MATOS, 2008), porém diversos outros relatos também atribuem a espécie propriedades antiinflamatórias (MOURÃO et al., 1999; AMARAL et al., 2005) e antitumorais (MACHADO & MELHO-JÚNIOR, 2009). Em ambos os casos, as partes aéreas da espécie, especialmente as folhas, são relatadas como parte utilizada (AMARAL et al., 2005; COSTA et al., 2006; FORTES et al., 2006; TREVISAN et al., 2006; LORENZI & MATOS, 2008).

Considerando a composição química das folhas das espécies do gênero *Kalanchoe*, a literatura relata a presença de polissacarídeos, antocianidinas, flavonoides e bufadienolídeos. Entretanto, para a espécie *K. brasiliensis*, especial destaque tem sido dado aos flavonoides em virtude do potencial biológico dos mesmos (COSTA et al., 2008; CRUZ et al., 2011, 2012). Sob este aspecto, diversas das propriedades têm sido atribuídas aos flavonoides glicosilados contendo como aglicona a patuletina (3,3',4',5,7-pentaidroxi-6-metoxiflavona), além de quercitrina e isoquercitrina (COSTA et al., 2006, 2008; TREVISAN et al., 2006; ABDELLAOUI et al., 2010; COSTA et al., 2015).

Apesar do potencial biológico e do interesse da comunidade científica, a espécie ainda não integra códigos oficiais ou apresenta especificações de qualidade que norteiem o desenvolvimento e a fabricação de produtos derivados que atendam as especificações sanitárias em vigor (BRASIL, 2010).

Neste contexto de controle de qualidade, a quantificação de metabólitos secundários ocupa papel de destaque e tem sido um dos maiores desafios da atualidade. Embora o emprego de espectrofotometria UV-Vis para análise matrizes vegetais tenha sido objeto de controvérsia no meio científico em virtude da baixa especificidade, seu emprego se mantém em diversos códigos oficiais devido à simplicidade e o baixo custo operacional, fazendo com que a técnica seja amplamente empregada no controle de qualidade de drogas vegetais e derivados (SILVA et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; MARQUES et al., 2012, 2013). Considerando a quantificação de flavonoides por UV-Vis em matrizes vegetais, quer seja através do procedimento originalmente

desenvolvido por Christ & Müller (1960) para agliconas livres e heterosídeos O-glicosilados, ou ainda, através da metodologia modificada para drogas contendo flavonoides C-glicosilados (SCHMIDT & GONZÁLEZ ORTEGA, 1993); ganha destaque quando é considerada a natureza sinérgica de produtos fitoterápicos (WAGNER, 2011). Neste contexto, a adoção de uma ou duas substâncias biologicamente ativas como marcadoras, desempenham papel importante para controle qualidade químico, como parâmetro de autenticidade ou como referência para o desenvolvimento tecnológico de produtos; porém, com frequência são incapazes de traduzir com fidelidade a resposta terapêutica resultante da complexa mistura de preparados vegetais (LIANG et al., 2004; WAGNER, 2011). Este tipo de abordagem ganha ênfase quando as respostas biológicas desejadas são tipicamente multifatoriais, tais como antioxidante (DU et al., 2013; SILVA et al., 2014), antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2012; GAUTAM et al., 2013) ou ambas (MAHBOUBI et al., 2012; MATEJÍC et al., 2012).

Portanto, diante do potencial terapêutico das folhas de *K. brasiliensis* e da conhecida composição química majoritariamente de flavonoides, o objetivo deste estudo foi avaliar e validar procedimento para quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria que permita a realização do controle de qualidade desta droga vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Camb. foram cultivadas e fornecidas pela ASMARANA Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda (Macaíba – RN). O material vegetal foi identificado pelo departamento de Biologia/UFRN, e a exsicata foi depositada no herbário sob número de registro 5468.

2.2 Preparação da amostra

O material vegetal fresco foi processado por turbólise com etanol 50% (v/v) na proporção droga:solvente de 1:1 (m/v). O extrato foi filtrado através de papel de filtro sob vácuo e a solução obtida armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

2.3 Seleção do comprimento de onda para leitura

Cerca de 4,0 mL da solução extrativa foram

transferidos para balão volumétrico de 25,0 mL, adicionada de 2,0 mL de cloreto de alumínio 5% (m/v) e o volume completado com etanol 50% (v/v). Após 15 minutos a solução amostra (SA) foi submetida à varredura em espectrofotômetro (200 a 500 nm) empregando a solução extrativa sem adição de AlCl_3 como solução de compensação (SC).

2.4 Avaliação do tempo de complexação e concentração de AlCl_3 sobre a resposta do método

Os efeitos do tempo de reação e da concentração de AlCl_3 sobre a resposta do método foram estudados através de um desenho composto central (DCC) do tipo 2^2 empregando como fatores a concentração de AlCl_3 (2,5 e 7,5%; m/v) e o tempo de reação (15 e 35 min), adicionado de 5 pontos centrais e 4 pontos estrelas. A matriz experimental do DCC está representada na tabela 1 e cada experimento foi realizado em triplicata.

A variável dependente estudada (resposta) foi a absorvância, para qual foi estabelecido um modelo de segunda ordem (Equação 1). A análise estatística do modelo foi realizada através do método dos mínimos quadrados e o modelo matemático obtido foi usado para gerar superfície resposta com o auxílio do programa computacional STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA).

$$Y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{11} \cdot (X_1)^2 + b_{22} \cdot (X_2)^2$$

(Equação 1)

2.5 Curva de Calibração

Foram tomadas alíquotas de 2,0 a 15,0 mL da solução extrativa; transferidas para balão volumétrico de 25 mL, e submetidas à reação com 2,0 mL de solução de AlCl_3 5% (m/v). Como solução de compensação foi empregada a própria solução extrativa sem adição da solução de AlCl_3 . A curva de calibração representa a média de três curvas determinadas em triplicata, após análise estatística através do método dos mínimos quadrados com o auxílio do programa computacional STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA).

2.6 Precisão

As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente, e os níveis de repetibilidade e precisão intermediária foram estudados. Os dados foram avaliados através dos coeficientes de variação e de análise de variância de duas entradas, com o auxílio do programa computacional Microsoft Excel (Microsoft, USA).

2.7 Robustez preliminar

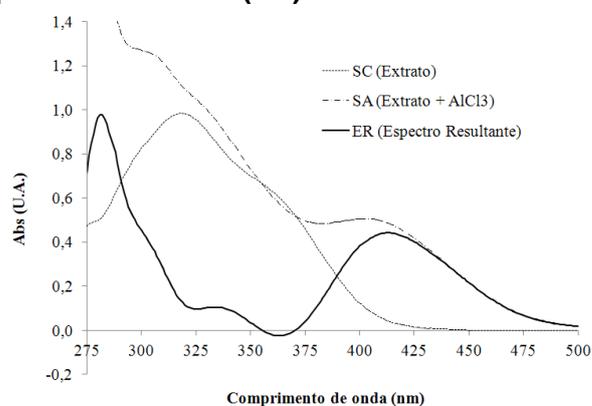
A robustez do procedimento foi investigada através de pequenas mudanças intencionais nas condições experimentais: concentração de AlCl_3 (4,5 a 5,5%; m/v) e comprimento de onda de leitura (410 a 414 nm). As determinações foram realizadas em triplicata e avaliadas através do coeficiente de variação com o auxílio do programa computacional Microsoft Excel (Microsoft, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comprimento de onda para leitura

A figura 1 mostra os espectros de varredura da solução extrativa sem AlCl_3 (SC) e da solução extrativa após adição de AlCl_3 (SA), empregando o solvente como compensação; e, solução extrativa após adição de AlCl_3 usando a solução sem AlCl_3 como compensação (ER). Como pode ser observado na figura, a adição de AlCl_3 promove o deslocamento do comprimento de onda máximo de 320 nm (SC) para 412 nm (SA). O deslocamento batocrômico, acompanhado de efeito hiperacrômico fica nítido no espectro resultante (ER) que, após compensação com a própria solução extrativa, promove o surgimento do novo máximo em 412 nm com mudança na absorvidade oriundo da formação de complexos entre o alumínio e flavonoide.

Figura 1 - Espectros de varredura para: extrato de *K. brasiliensis* (SC); extrato de *K. brasiliensis* após a adição de cloreto (SA); e o espectro resultante (ER).



A figura 2 mostra a superfície de resposta gerada pelos dados do desenho composto central (Tabela 1). O modelo matemático que explica a superfície é expresso pela equação 2:

$$Y = 0,339 - 0,0028 \cdot T + 0,0015 \cdot T^2 + 0,0007 \cdot T \cdot A + 0,0362 \cdot A - 0,0122 \cdot A^2$$

(Equação 2)

onde: T = Tempo de reação; A = concentração de AlCl_3 .

Figura 2 - Superfície de resposta para absorvância da solução extrativa de *K. brasiliensis*.

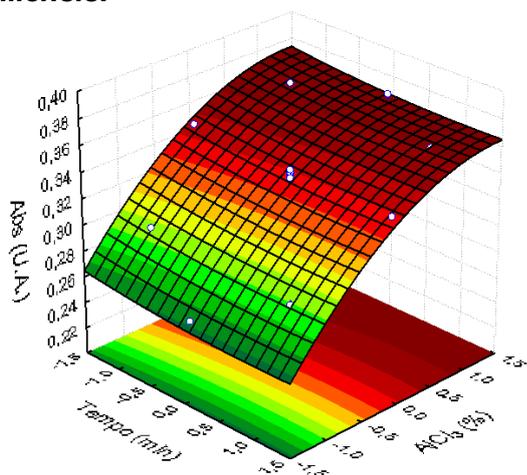


Tabela 1 - Matriz do DCC aplicado para avaliar a influência do tempo de reação e concentração de AlCl_3 sobre a resposta do método em absorvância.

Exp	Variáveis Codificadas		Variáveis naturais		Abs. (U.A.)
	Tempo (min)	AlCl_3 (%)	Tempo (min)	AlCl_3 (%)	
1	-1	-1	15	2,5	0,298
2	-1	1	15	7,5	0,365
3	1	-1	35	2,5	0,289
4	1	1	35	7,5	0,359
5	0	0	25	5	0,338
6	0	0	25	5	0,339
7	0	0	25	5	0,340
8	0	0	25	5	0,342
9	0	0	25	5	0,336
10	-1,414	0	39,14	5	0,345
11	1,414	0	10,86	5	0,340
12	0	-1,414	15	8,54	0,261
13	0	1,414	15	1,46	0,369

A análise estatística através de ANOVA revelou que ambos os fatores selecionados, concentração de AlCl_3 e tempo de reação, exercem influência significativa sobre a variável de resposta (Tabela 2). De acordo com estes resultados, ambos os termos relacionados à concentração de reagente (linear e quadrático) foram importantes. Por outro lado, apenas o termo linear para tempo de reação apresentou influência sobre a resposta. Por fim, não foi observada qualquer interação entre os fatores.

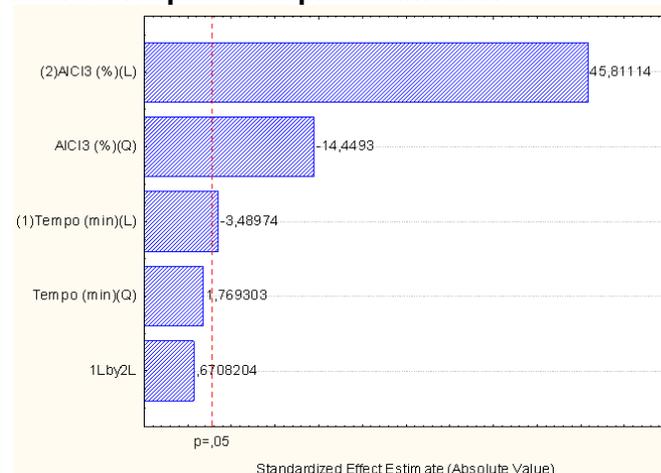
Tabela 2 - Análise estatística por ANOVA e teste *t* para o DCC.

Fonte de variação	F	t
AlCl_3 (linear)	2098,66*	0,072*
AlCl_3 (quadrático)	208,78*	-0,025*
Tempo (linear)	12,18*	-0,006*
Tempo (quadrático)	3,13	0,003
Interação (Tempo x AlCl_3)	0,45	0,002

*Significativo para $\alpha \leq 0,05$

Através do cálculo dos efeitos dos fatores através do teste *t* (Tabela 2) e do gráfico de paretos (Figura 3), é possível estabelecer o tipo e a intensidade da contribuição de cada termo do modelo matemático. Considerando os termos significativos, apenas o termo linear para o reagente é positivo. Isto quer dizer que a mudança de nível favorece a resposta estudada. Ou seja, com o aumento da concentração de AlCl_3 ocorre incremento na absorvância lida. O oposto pode ser dito do termo linear para o tempo. Embora bem menos importante, com o passar do tempo o valor da absorvância diminui, desfavorecendo a resposta do método. Considerando os termos quadráticos, a interpretação é diferente da adotada para os termos lineares. A inserção de termos quadráticos é necessária para explicar fenômenos em que a resposta segue comportamento não linear no campo experimental. Adicionalmente, é possível estabelecer a natureza da superfície: máximo, mínimo ou em forma sela. Assim, o sinal negativo observado para o termo quadrático para a concentração de AlCl_3 indica um sistema do tipo convexo (MYERS & MONTGOMERY, 1995; SOARES et al., 2005).

Figura 3 - Gráfico de paretos para avaliação dos efeitos padronizados dos fatores do DCC sobre a resposta do procedimento.



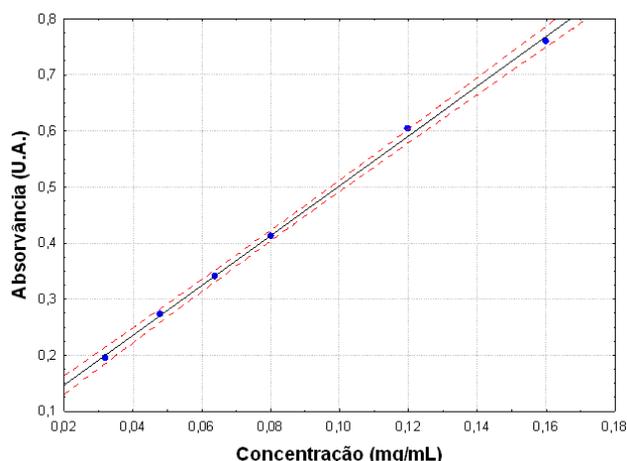
Dessa forma, as condições escolhidas por determinarem uma resposta ótima para o doseamento de flavonoides na solução extrativa

foram 5% de AlCl_3 e 15 minutos para a reação de complexação.

Linearidade

A figura 4 mostra a curva de calibração ($y = 0,058 + 4,446x$) realizada para a solução extrativa. As absorvâncias foram determinadas em 412 nm após varredura, e apresentou linearidade ($R^2 = 0,9988$), levando em consideração a complexidade da matriz vegetal.

Figura 4 - Curva de calibração para a solução extrativa de *K. brasiliensis*.



Precisão

Os procedimentos propiciaram respostas espectrofotométricas precisas nos dois níveis analisados: repetibilidade e precisão intermediária. Para a repetibilidade, foram preparadas seis amostras oriundas de pesagens independentes e lidas em triplicata após a reação com AlCl_3 . O procedimento apresentou desempenho dentro dos limites preconizados na literatura com coeficiente de variação igual a 3,71% (BRASIL, 2003; FB5, 2010). Já para o parâmetro de precisão intermediária, foram investigadas simultaneamente as contribuições das variabilidades oriundas da preparação de amostra, dias e analistas. Para tanto, dois analistas prepararam cada um, em dois dias diferentes, três amostras a partir de três pesagens independentes e submetidas à reação com AlCl_3 em triplicata.

A avaliação dos resultados através do coeficiente de variação demonstrou que pouca interferência pode ser detectada para as variáveis. Enquanto a variação percentual para a preparação das amostras ficou entre 0,50 e 1,31%, a variação percentual observada entre os dias foram de 1,35 e 1,86%; e, os coeficientes de variação para os analistas foram de 0,98 e 0,88%. Considerando a natureza multifatorial da análise, os dados foram

avaliados através de uma ANOVA multifatorial e não foi observada qualquer significância para os fatores independentes ou para interação entre os mesmos (Tabela 3).

Tabela 3 - Repetibilidade e precisão intermediária do método para solução extrativa das folhas de *K. brasiliensis* (resultados expressos em absorvância).

	Analista 1		Analista 2	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Amostra 1	0,349	0,363	0,345	0,347
Amostra 2	0,366	0,354	0,344	0,338
Amostra 3	0,360	0,363	0,350	0,335
Média	0,358	0,360	0,346	0,340
Desvio padrão	0,009	0,005	0,003	0,006
CV%	2,41	1,44	0,93	1,84
Interanalistas	0,351 ± 0,011 (3,22 %)			
Interdias	0,351 ± 0,025 (0,49 %)			

Robustez preliminar

Através da introdução deliberada de pequenas variações foi possível investigar a influência da variação do comprimento de onda e da concentração de AlCl_3 sobre a resposta do método. Considerando a influência da concentração de AlCl_3 , a análise dos dados experimentais revelou que as pequenas variações introduzidas na concentração do reagente (cerca de 10%) não foram capazes de causar modificação importante na absorvância lida (Tabela 4). Embora a concentração de AlCl_3 seja um fator reconhecidamente crítico, nas condições testadas a variabilidade observada foi inferior a 5% e encontra-se dentro dos valores preconizados pela literatura (BRASIL, 2003).

Tabela 4 - Robustez do método - análise da variação da concentração de AlCl_3 (resultados expressos em absorvância).

Replicatas	AlCl_3 (%)		
	4,5	5	5,5
R1	0,431	0,461	0,461
R2	0,421	0,454	0,454
R3	0,437	0,457	0,458
Média	0,430	0,457	0,458
Desvio padrão	0,008	0,004	0,004
CV%	1,88	0,77	0,77
Média geral	0,448 ± 0,015 (3,28 %)		

A influência do comprimento de onda sobre a resposta de métodos analíticos espectrofotométricos é notória em virtude do estabelecimento de máximos de absorção. Entretanto, o emprego de equipamentos diferentes ou os pequenos deslocamentos decorrentes das condições reacionais podem provocar leves

flutuações as quais podem interferir na resposta esperada. Tais interferências, embora mais raras, estão mais associadas à faixa de comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção. Nos casos em que ocorre “platô” na região do máximo, haverá menor possibilidade de variação. Considerando o doseamento de flavonoides em *K. brasiliensis* é possível observar que embora o máximo de absorção ocorra em 412 nm, a resposta não sofre grandes variações nos comprimentos de onda mais próximos (Tabela 5) (PETRY et al., 2001; SCHIMIDT & ORTEGA, 1993).

Tabela 5 - Robustez preliminar do método: análise da variação das amostras e do comprimento de onda (resultados expressos em absorvância).

Amostras	Comprimento de onda (nm)				
	410	411	412	413	414
A1	0,475	0,478	0,480	0,481	0,480
	0,474	0,477	0,479	0,480	0,479
	0,478	0,482	0,484	0,485	0,485
A2	0,481	0,485	0,487	0,488	0,488
	0,475	0,478	0,481	0,482	0,482
	0,477	0,480	0,482	0,483	0,483
A3	0,479	0,482	0,485	0,486	0,486
	0,474	0,477	0,479	0,481	0,480
	0,477	0,480	0,482	0,483	0,483

A análise dos resultados demonstra que a variação causada pela modificação no comprimento de onda de leitura não causa interferência significativa na resposta analítica (Tabela 6).

Tabela 6 - Robustez do método: análise estatística das fontes de variação do método (amostra e comprimento de onda).

Fontes de variação	Média ± sd (CV%)
λ (nm)	0,481 ± 0,003 (0,57)
Amostras	0,481 ± 0,001 (0,24)

λ = comprimento de onda

Os resultados demonstraram que o procedimento foi considerado aceitável, pois todos os coeficientes de variação atendem o limite especificado de 5% (BRASIL, 2003).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o método espectrofotométrico desenvolvido foi adequado para doseamento de flavonoides na solução extrativa de *Kalanchoe brasiliensis*. As condições escolhidas por determinarem uma maior resposta para doseamento foram 5% de solução de cloreto

de alumínio e 15 minutos de reação. O método apresentou boa precisão ($CV \leq 5\%$), linearidade ($R^2 = 0,9988$) e mostrou ser robusto, comprovando sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte do PPGCF-UFRN, PIBIC/CNPq-UFRN, CNPq (477131/2007-7, 483870/2011-0) e FAPERN (FAPERN/MCT/CT-INFRA/CNPq - PPP 2007).

REFERÊNCIAS

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

AMARAL, A.C.F.; SIMÕES, E.V.; FERREIRA, J.L.P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Curitiba: Focruz, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 23 mar. 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010.

CHRIST, B.; MULLER, K.H. Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. **Archive der Pharmazie**, v. 293, n. 65, p. 1033-1042, 1960.

COSTA, S.S.; SOUZA, M.L.; IBRAHIM, T.; MELO, G.O.; ALMEIDA, A.P.; GUETTE, C.; FÉRÉZOU, P.J.; KOATZ, V.L.G. Kalanchosine Dimalate, an Anti-inflammatory Salt from *Kalanchoe brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 815-818, 2006.

COSTA, S.S.; MUZITANO, M.F.; CAMARGO,

- L.M.M.; COUTINHO, M.A.S. Therapeutical potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other secondary metabolites. **Natural Products Communication**, v. 3, p. 2151-2164, 2008.
- COSTA, A.C.O.; FERNANDES, J.M.; NEGREIROS, T.S.; MENDONÇA, J.; TOMAZ, J.; LOPES, N.P.; SOARES, L.A.L.; ZUCOLOTTI, S. M. Quantification of Chemical Marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves by HPLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 795-800, 2015.
- CUNHA, F.P.; COSTA, L.J.L.; FERNANDES, A.J.D.; SOUZA, T.P.; SOARES, L.A.L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 647-652, 2009.
- CRUZ, P.B.P.; CHEDIER, L.M.; FABRI, R.L.; PIMENTA, D.S. Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers under light and temperature levels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1435-1441, 2011.
- CRUZ, P.B.P.; CHEDIER, L.M.; PEIXOTO, P.H.P.; FABRI, R.L.; PIMENTA, D.S. Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 211-217, 2012.
- DU, L.-J.; GAO, Q.-H.; JI, X.-L.; MA, Y.-J.; XU, F.-Y.; WANG, M. Comparison of Flavonoids, Phenolic acids and Antioxidant Activity of Explosion-puffed and Sun-dried jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 48, p. 11840-11847, 2013.
- FERNANDES, A.J.D.; FERREIRA, M.R.A.; RANDAU, K.P.; DE SOUZA, T.P.; SOARES, L.A.L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2012.
- FORTES, T.O.; ALVIANO, D.S.; TUPINAMBÁ, G.; PADRO, T.C.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, C.S.; SELDINA, L. Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. **Microbiological Research**, v. 63, n. 2, p. 200-207, 2006.
- GAUTAM, M.K.; GANGWAR, M.; NATH, G.; RAO, C.V.; GOEL, R.K. In-vitro antibacterial activity on human pathogens and total phenolic, flavonoid contents of *Murraya paniculata* Linn. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1660-S1663, 2013.
- LIANGA, Y.-Z.; XIEB, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. Ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- MACHADO, M.C.F.P.; MELO-JUNIOR, M.R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2009.
- MAHBOUB, M.; KHAMECHIAN, T.; KAZEMPOUR, N. Total Phenolic and Flavonoids Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Azilia eryngioides* Extracts. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 2, n. 3, p. 144-150, 2012.
- MARQUES, G.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.
- MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; ROLIM, L.A.; XAVIER, H.S.; NETO, P.J.R.; SOARES, L.A.L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.1, p. 51-57, 2013.
- MATEJIĆ, J.S.; DŽAMIĆ, A.M.; MIHAJLOV-KRSTEV, T.; RANĐELOVIĆ, V.N.; KRIVOŠEJ, Z.Đ.; MARIN, P.D. Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three *Seseli* L. taxa. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 6, p. 1116-1122, 2012.
- MOURÃO, R.H.V.; SANTOS, F.O.; FRANZOTTI, E.M.; MORENO, M.P.N.; ANTONIOLLI, A.R. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD₅₀) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Camb.)

- leaves picked before and during blooming. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 352–354, 1999.
- MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. New York: Wiley, 1995.
- OLIVEIRA, K.A.M.; OLIVEIRA, G.V.; BATALINI, C.; ROSALEM, J.A.; RIBEIRO, L.S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211-222, 2012.
- PETRY, R.D.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride – flavonoid complex. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.
- SCHMIDT, P.C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoid gehaltes on *Passiflorae herba*. **Deutsch Apotheker Zeitung**, v. 47, p. 17-26, 1993.
- SILVA, K.G.H.; JÚNIOR, F.H.X.; FARIAS, I.E.G.; SILVA, A.K.A.; NETO, J.A.C.; SOUZA, L.C.A.; SANTIAGO, R.R.; JUNIOR, F.A.; JÚNIOR, T.N.; SOARES, L.A.L.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; EGITO, E.S.T. Stationary cuvette: a new approach to obtaining analytical curves by UV-VIS spectrophotometry. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 4, p. 265-271, 2009.
- SOARES, L.A.L.; BASSANI, V.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niuri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 2, p. 203-207, 2003.
- SOARES, L.A.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; SCHMIDT, P.C. Optimization of Tablets Containing a High Dose of Spray-Dried Plant Extract: A Technical Note. **AAPS PharmaSciTech**, v. 6, n. 3, p. E67-E71, 2005.
- TREVISAN, M.T.S.; BEZERRA, M.Z.B.; SANTIAGO, G.M.P.; FEITOSA, C.M.; VERPOORTE, R.; FILHO, R.B. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.
- WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34–37, 2011.

