

Desenvolvimento de fitomedicamentos para cicatrização de feridas cutâneas a partir de *Kalanchoe pinnata*: recentes avanços no potencial terapêutico inovador de uma planta medicinal de interesse para o Sistema Único de Saúde – SUS

Marcela Araújo Soares Coutinho^{a#}, Livia Marques Casanova^a, Luana Beatriz dos Santos Nascimento^b, Diogo Leal^a, Celia Palmero^c, Helena Keiko Toma^d, Elisabete Pereira dos Santos^d, Luiz Eurico Nasciutti^c e Sônia Soares Costa^a

^aInstituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; ^bInstituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; ^cInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; ^dFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; [#]Endereço atual: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro (Maracanã), Rio de Janeiro, RJ 20270-021, Brasil.

Resumo

O objetivo do estudo foi desenvolver formulações farmacêuticas a partir do saião-roxo - *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) - e avaliar sua ação cicatrizante. Folhas de *K. pinnata* (KP), espécie largamente cultivada no Brasil e integrante da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), são usadas popularmente para curar feridas. Assim, KP apresenta grande potencial para a indústria farmacêutica nacional de fitoprodutos, em especial para uso na atenção primária à saúde. Duas décadas de estudos multidisciplinares pioneiros, realizados por nosso grupo, permitiram descrever o amplo perfil imunomodulador de KP e seus constituintes químicos. Ademais, demonstramos os efeitos anti-inflamatório, antiedematogênico e antinociceptivo de seu flavonoide majoritário (FM), quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnopiranosídeo, marcador biológico para o controle de qualidade de fitoterápicos de KP. Seu processo de obtenção, otimizado por nosso grupo, resultou em um método mais econômico e eficaz. Amostras liofilizadas do extrato aquoso de folhas de KP (20% p/v, 50-60°C, 30 min; caracterizado por HPLC-ESI-MS/MS), bem como do FM isolado, foram incorporadas em cremes (6% e 0,15 %, respectivamente). Estes foram avaliados topicamente por 15 dias em modelo murino de ferida por excisão.

As formulações foram estáveis e eficazes na contração das feridas, perante os controles positivo (medicamento de referência) e negativo. No 8º dia, observamos $61,7 \pm 2,8\%$ e $61,9 \pm 4,9\%$ de cicatrização em animais tratados com cremes à base de extrato de KP e de FM, respectivamente, percentuais superiores ao controle positivo ($42,8\% \pm 5,2\%$). Resultados promissores foram alcançados no 12º dia de tratamento, com cicatrização de $95,3 \pm 1,2\%$ (creme com extrato de KP) e $97,5 \pm 0,8\%$ (creme com FM). Ainda, os cremes promoveram melhor re-epitelização e formação de fibras mais densas de colágeno. Portanto, este estudo inovador demonstrou a eficácia de formulações à base do extrato de KP e do seu flavonoide principal na cicatrização de feridas, destacando-se o extrato como a opção mais econômica, rápida e viável para a produção. Esses resultados, somados aos anteriores do nosso grupo, são um estímulo para o desenvolvimento de um medicamento a partir dessa planta medicinal que, embora não nativa, apresenta fácil cultivo e grande potencial farmacêutico aplicável ao SUS. Um fitoterápico cicatrizante à base de *K. pinnata*, visando uma condição clínica que afeta amplamente a população no país, trará impacto tecnológico positivo e benefício social.

Apresentação

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae), conhecida popularmente como saião-roxo, é uma planta amplamente utilizada medicinalmente no Brasil e no mundo para tratamento de feridas, furúnculos e demais processos inflamatórios tais como gastrite, úlcera, artrite, diabetes, entre outros (Muzitano, Cruz, et al., 2006; Costa et al., 2008; Lorenzi & Matos, 2008; Coutinho et al., 2012). Devido à sua importância medicinal e etnobotânica, a espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, a RENISUS (Ministério da Saúde, 2009).

Estudos focados em aspectos farmacológicos e usos de *K. pinnata* mostram um padrão exponencial de crescimento, com um aumento de cerca de 70% no número de trabalhos publicados com a espécie nos últimos 10 anos (Nascimento, 2018). O amplo uso e a grande importância dessa espécie justificam o interesse crescente em seu potencial terapêutico e no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Duas décadas de estudos multidisciplinares pioneiros, realizados por nosso grupo, permitiram descrever o amplo perfil imunomodulador de extratos de *K. pinnata* e seus constituintes químicos, demonstrando, por exemplo, as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antileishmaniose, antianafilática e antialérgica de extratos aquosos e

flavonoides isolados de folhas e flores (Costa et al., 2008; Ferreira et al., 2014; Coutinho et al., 2012; Da Silva et al., 1995; Da-Silva et al., 1999; Cruz et al., 2008; Muzitano, Cruz, et al., 2006; Nascimento et al., 2013). Outros grupos de pesquisadores demonstraram ainda a atividade antimicrobiana e cicatrizante de diferentes extratos obtidos de folhas dessa espécie (Khan et al., 2004; Nayak et al., 2010; Suprpto et al., 2015; Tatsimo et al., 2012).

Entre os constituintes presentes em extratos aquosos de folhas de *K. pinnata*, o flavonoide 3-O- α -L-arabinopiranosídeo- (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo de quercetina merece destaque. Essa substância fenólica corresponde a 65% da área total dos sinais cromatográficos detectados por cromatografia líquida de alta eficiência nesses extratos, sendo, portanto, seu componente majoritário. Tal flavonoide é uma molécula incomum na natureza, sendo descrito em poucas espécies vegetais, sempre como componente minoritário (Nascimento et al., 2018). Algumas propriedades farmacológicas importantes já foram descritas para este flavonoide por nosso grupo, tais como sua atividade antileishmaniose, anti-inflamatória, antiedematogênica e antioceceptiva, todas comprovadas em modelos *in vivo* (Muzitano, Tinoco, et al., 2006; Costa et al., 2008; Ferreira et al., 2014). Portanto, esse flavonoide pode ser considerado um marcador biológico para o controle de qualidade de fitoterápicos desenvolvidos com extratos de *K. pinnata*. Cabe ressaltar ainda, que seu processo de obtenção, utilizando água como solvente extrativo, foi otimizado por nosso grupo, resultando em um método mais econômico e eficaz (Nascimento et al., 2018). Ademais, demonstramos que a sua produção pode ser eliciada durante o cultivo da planta, usando diferentes fatores ambientais (Nascimento et al., 2013, 2015; Nascimento, 2018).

Baseando-se no acima mencionado, o estudo aqui apresentado objetivou desenvolver formulações farmacêuticas a partir de extratos aquosos de folhas de *K. pinnata* e de seu flavonoide majoritário isolado, para avaliação de sua ação cicatrizante. Esta planta ganha destaque por ter sido alvo de estudos prévios comprovando as atividades biológicas relacionadas ao processo cicatricial, por já dispormos da caracterização da composição química desses extratos e por esses extratos não apresentarem efeitos citotóxicos.

Adicionalmente, os resultados farmacológicos obtidos até o momento por nosso grupo, usando água como solvente extrativo do material vegetal, justificam os esforços na continuidade dos estudos do potencial cicatrizante dos extratos aquosos das folhas de *K. pinnata*. É importante ressaltar que a extração com água implica em menores custos,

em menor produção de resíduos poluentes, maior facilidade de manipulação e maior similaridade com o uso popular, além de favorecer uma menor toxicidade atrelada (Chemat et al., 2012). Ainda, quando se pensa na produção em larga escala de um produto farmacêutico à base de *K. pinnata*, a facilidade de propagação da espécie por meio de gemas presentes no bordo das folhas representa um aspecto altamente positivo para o investimento dos esforços nos estudos com a planta (Boiteau & Alorge-Boiteau, 1995). Levando em conta os aspectos mencionados, o estudo tem inquestionável relevância no panorama da inovação em saúde pública no país.

O presente trabalho apresentará uma versão traduzida e expandida do artigo em formato *short communication* intitulado **“Wound healing cream formulated with *Kalanchoe pinnata* major flavonoid is as effective as the aqueous leaf extract cream in a rat model of excisional wound”**, publicado na revista científica *Natural Product Research*. O artigo na íntegra encontra-se disponível no **Anexo 1** do presente trabalho.

Introdução

Feridas consistem em quaisquer injúrias físicas, químicas ou térmicas que resultam em aberturas ou perda da integridade da pele, o que inclui cortes, queimaduras, úlceras e escaras, de gravidades distintas de acordo com a possível ocorrência de infecção, com a duração da mesma e com o grau de dificuldade do processo de cicatrização (Agyare et al., 2016). Além de trazerem riscos à saúde física dos pacientes, feridas acarretam impactos emocionais diretos às pessoas acometidas pelas mesmas (Fan et al., 2011; Pereira & Bártolo, 2016). Estima-se que feridas acometem cerca de 0,2% da população mundial e os gastos com seu tratamento ultrapassaram 3 bilhões de dólares/ano em 2007 podendo atingir o valor de 25 bilhões de acordo com dados mais atuais (Nogueira Cortez et al., 2020; Fan et al., 2011).

No Brasil ainda não existem dados precisos da incidência, prevalência e gastos associados às feridas agudas ou crônicas. Entretanto, há indícios de que o tratamento de feridas crônicas, especialmente úlceras por pressão em pacientes hospitalizados, tenha alto custo para o sistema público de saúde brasileiro (Andrade et al., 2016; Lima et al., 2016; Rocha et al., 2018). Elas representam, por exemplo, a segunda maior causa de afastamento do trabalho no país (Nogueira Cortez et al., 2020; Campos et al., 2008).

Produtos de uso tópico comumente utilizados para cicatrização incluem cremes e pomadas contendo agentes antimicrobianos e enzimas proteolíticas, que atuam em fases

distintas do processo cicatricial (Fan et al., 2011; Mandelbaum et al., 2003). Apesar de eficazes, esses produtos podem apresentar efeitos adversos e induzir a resistência de alguns microrganismos, dificultando o tratamento, além de apresentarem um custo elevado. Neste contexto, as plantas representam uma alternativa promissora no desenvolvimento de produtos cicatrizantes mais acessíveis à população (Działo et al., 2016; Maver et al., 2015; Serafini et al., 2015; Pereira & Bártolo, 2016).

Diversas plantas medicinais são etnofarmacologicamente utilizadas para tratar feridas em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento. Muitas delas tiveram a atividade cicatrizante comprovada em ensaios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* (Lei et al., 2019; Agyare et al., 2016; Budovsky et al., 2015; Pazyar et al., 2014; Pereira & Bártolo, 2016; Schmidt et al., 2009). Esses estudos reforçam o potencial das plantas medicinais como alternativas custo-efetivas para o tratamento de feridas (Pereira & Bártolo, 2016). De fato, já estão disponíveis no mercado alguns medicamentos fitoterápicos com ação cicatrizante. Entre estes, destacam-se o Aloax® (proveniente de folhas de *Aloe vera*), indicado para tratar queimaduras, e o Fitoscar® (obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens*), indicado como agente cicatrizante em vários tipos de lesões de pele (Apsen, 2019; Ativus Farmaceutica, 2016).

Kalanchoe pinnata (Lamarck) Persoon (aqui abreviado por KP, **Figura 1**) é uma espécie amplamente usada no tratamento de feridas, sob a forma de compressas e cataplasmas (Coelho-Ferreira, 2009; Cawich et al., 2014; Lorenzi & Matos, 2008). O uso tradicional de KP, sobretudo na cicatrização e em processos anti-inflamatórios, bem como no tratamento de doenças relacionadas, tem sido a base para o desenvolvimento de estudos da constituição química dos extratos da planta, a fim de determinar as substâncias que poderiam ser responsáveis por tais atividades, justificando, assim, seu uso popular.

A administração oral e tópica de extratos aquosos e orgânicos de folhas de KP já foi avaliada em um modelo de ferida por excisão em ratos, mostrando atividade cicatrizante promissora (Khan et al., 2004; Nayak et al., 2010; Suprpto et al., 2015). Entretanto, independentemente do solvente utilizado para a extração e da forma como os extratos foram aplicados nas feridas (*in natura* ou em formulações farmacêuticas), nenhum desses estudos identificou, até o momento, os compostos bioativos responsáveis pela atividade cicatrizante.

Dando continuidade aos nossos esforços para validar cientificamente o uso popular de *K. pinnata* no tratamento de feridas cutâneas, o objetivo deste estudo foi desenvolver, avaliar e comparar duas formulações em um modelo de feridas excisionais em ratos: uma

contendo extrato aquoso quimicamente caracterizado de folhas de KP, e outra empregando seu flavonoide principal, quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo- (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-ramnopiranosídeo, para o qual demonstramos anteriormente atividade anti-inflamatória *in vivo* (Ferreira et al., 2014).



Figura 1. Aspecto geral de plantas da espécie *Kalanchoe pinnata*, com destaque para inflorescências e folhas. Fonte: arquivo pessoal.

Material e Métodos

Material vegetal

Folhas de plantas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (fora da fase de floração) foram coletadas em jardim domiciliar localizado no município de Araruama, estado do Rio de Janeiro – Brasil (22° 520' 22" S, 42° 200' 35" O) – Rio de Janeiro (RJ, Brasil). A exsicata de uma amostra florida da espécie foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob o registro número 292.697.

Extração de folhas e isolamento do flavonoide

Após a coleta, as folhas foram lavadas em água corrente e em seguida rinsadas com água destilada e posteriormente trituradas (2,08 kg). Após secagem do excesso de água à temperatura ambiente, o material foi seccionado e triturado em liquidificador com água

destilada (20 % p/v). A preparação foi aquecida durante 30 minutos, em temperatura controlada (50°-60°C). Os extratos foram filtrados em algodão e em papel de filtro, até obtenção de soluções translúcidas. Após liofilização, foram obtidos 93,14 g de extrato seco.

O flavonoide majoritário quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo- (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-ramnopiranosídeo (95% de pureza) foi isolado conforme descrito anteriormente (Coutinho et al., 2012).

Análises por CLAE-DAD-EM/EM

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos diodo acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM) foram realizadas em equipamento Thermo Scientific LCQ FLEET UPLC system (Thermo Fisher Scientific) (Faculdade de Farmácia, UFRJ). Como fase estacionária utilizou-se uma coluna de sílica de fase inversa RP-18 (LichroCART®/Lichrospher®100 – Merck) de dimensão 250 X 4 mm e com partículas de 5 μ m de diâmetro, mantida a 35°C. A fase móvel foi composta por água desionizada com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O gradiente utilizado, sob fluxo de 0,6 ml/min foi: 0-10 min (5-20% B), 10-20 min (20-22% B), 20-35 min (22-25% B), 35-40 min (25-30% B), 40-55 min (30-100% B) e 55-60 min (100% B).

As amostras foram solubilizadas em água/acetonitrila (9:1) para concentração final de 2 mg/ml (extrato) e 0,2 mg/ml (flavonoide) e filtradas em filtros de seringa de polipropileno (0,20 μ M; Econofilter, Agilent®). Foi injetado um volume de 10 μ l.

Os espectros de massas foram obtidos com hélio como gás de colisão na armadilha de íons (ion trap) e nitrogênio como gás auxiliar na fonte. Para ESI no modo de íon negativo, os seguintes parâmetros foram usados: temperatura capilar: 400 ° C, fluxo de gás de bainha: 35 l / min, fluxo de gás auxiliar: 10 l / min, tensão de spray: 5,5 kV. Uma largura de isolamento de 2 Da foi usada com um tempo de ativação de 30 ms para os experimentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM). A faixa de massa analisada foi de m / z 50 a 1000.

Análises por CLAE-DAD

As análises foram realizadas em cromatógrafo SPD-M10Avp (Shimadzu), com detector de rede de fotodiodos (Diode Array Detector – DAD), localizado na Central Analítica do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) - UFRJ, sob uma abrangência de comprimento de onda de 200-500 nm. Como fase estacionária utilizou-se uma coluna de sílica de fase inversa RP-18 (LichroCART®/Lichrospher®100 – Merck) de dimensão 250 X 4 mm e com partículas de 5 µm de diâmetro. A fase móvel foi composta por água desionizada, pH 3,2 ajustado com ácido fosfórico (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O gradiente utilizado, sob fluxo de 1 ml/min foi: 0-10 min (5-20% B), 10-20 min (20-22% B), 20-35 min (22-25% B), 35-40 min (25-30% B), 40-55 min (30-100% B) e 55-60 min (100% B).

As amostras foram preparadas solubilizando-se 5 mg dos extratos e 1 mg do flavonoide isolado 1,0 ml de água destilada. Foi injetado o volume de 20 µl de cada solução. O tempo total de cada eluição foi de 55 minutos, com fluxo de 1,0 ml/min.

Para análises quantitativas, uma curva analítica foi construída usando quercitrina (Sigma-Aldrich) como padrão (5, 20, 30, 50 and 75 µg/ml). O flavonoide majoritário de KP foi quantificado no extrato por meio da equação da curva analítica ($y = 26346x + 13522$; $R^2 = 0,9969$), empregando um fator de correção (massa molecular do flavonoide/massa molecular da quercitrina). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Desenvolvimento das formulações contendo extrato de folhas de KP e flavonoide majoritário

Para o preparo do creme base não iônico foram empregados os reagentes: monoestearato de glicerila (Embacaps) – 4 g, álcool cetosteárilico (Embacaps) – 8 g, álcool cetosteárilico etoxilado (ChemSpecs) – 2 g, vaselina líquida (Mapric) – 2 g, estearato de isoctila (Embacaps) – 3 g, fenoxietanol associado à parabenos (Pharma Special) - 0,3 g, glicerina (Fagron) – 7 g - e água purificada.

Os componentes da fase oleosa foram aquecidos, à temperatura controlada de 75°-80° C, para fusão dos componentes graxos. A fase aquosa também foi aquecida, separadamente, à mesma temperatura. Em seguida, adicionou-se lentamente a fase aquosa à fase oleosa, sob constante agitação (900 rpm), até homogeneização.

Após, dois produtos foram preparados (**Figura 2**): um creme com 6% de extrato de folhas de KP (60 mg/g) e um outro com 0,15% de flavonoide majoritário isolado (1,5 mg/g).

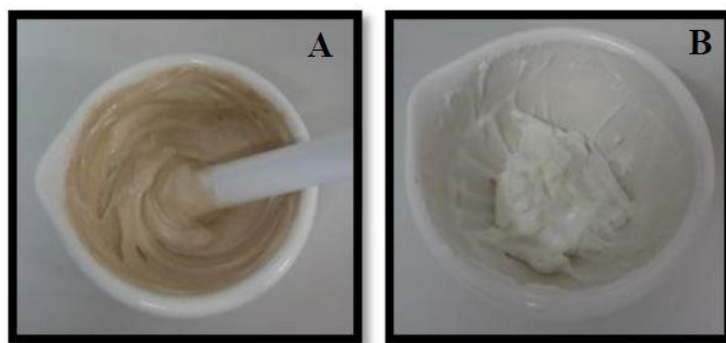


Figura 2. Aspecto geral dos cremes preparados a partir de extrato de folhas de *K. pinnata* (A) e do flavonoide majoritário de KP (B).

Análises das formulações: testes de estabilidade e ensaios microbiológicos

As formulações foram avaliadas em um estudo de estabilidade no qual os produtos preparados foram mantidos sob três condições: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e aquecimento ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aliquotas foram analisadas imediatamente depois da preparação (tempo 0 – valor de referência) e nos 30º e 60º dias, por meio de inspeção visual e parâmetros de densidade.

As análises microbiológicas foram conduzidas Laboratório de Controle Microbiológico de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LACMAC) – credenciado à ANVISA (Faculdade de Farmácia, UFRJ). Os seguintes parâmetros foram avaliados de acordo com os requisitos da Farmacopeia Brasileira para produtos não estéreis: presença de *Escherichia coli* e bactérias fecais, presença de fungos e leveduras, presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e contagem total de microorganismos aeróbicos (Brasil, 2010). Para essas análises, 5 g de cada creme foram inoculados em meio de cultura apropriado (Casoy broth, 45 ml). A contagem total de microorganismos anaeróbicos foi avaliada em triplicata por inoculação do meio Casoy com as amostras (0,1 e 1,0 ml) em placas estéreis contendo meio apropriado para bactérias (meio de ágar Tryptic Soy incubado a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h) e para fungos e leveduras (meio ágar batata dextrose com adição de ácido tartárico 1,5% incubado a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias). O restante do meio Casoy com as amostras foi incubado a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após este período de incubação, uma alíquota foi semeada em diferentes meios para a

detecção de bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus* (ágar Baird-Parker), *Pseudomonas aeruginosa* (ágar cetrímida), *Escherichia coli* e outras bactérias fecais (meio MacConkey), todos eles incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

Animais

Foram empregados vinte ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos (200 - 250 g), obtidos no biotério central da UFRJ (Centro de Ciências da Saúde). Os animais foram mantidos individualmente, em um ciclo de luz/escuro de 12:12 horas, com temperatura ambiente controlada, água e ração ad libitum. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (CEUA-UFRJ), sob o número NPPN03.

Ensaio de atividade cicatrizante

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de cinco ratos cada: a) controle negativo (creme base), b) controle positivo, um medicamento comercializado para o tratamento de feridas contendo base de neomicina (3,5 mg) e bacitracina (250 UI) por grama / creme, c) formulação contendo extrato de folha de KP e d) formulação contendo flavonoide majoritário de KP.

Após anestesia com cetamina (5 mg/kg) e xilazina (2 mg/kg), cada animal foi colocado em prancheta cirúrgica para realização de tricotomia da região dorsal e assepsia. Foi realizada excisão (1,0 cm²) com pinça, lâmina cirúrgica e tesoura pontiaguda. As amostras foram aplicadas topicamente, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos. O fechamento da ferida foi avaliado em dias alternados (1, 4, 8, 12 e 15) pelo programa Sketchup® 8, por meio de fotos milimetradas. O método da poli-linha foi usado para determinar as respectivas áreas e, em seguida, a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de fechamento da ferida} = \frac{\text{área inicial da ferida} - \text{área final da ferida}}{\text{área inicial da ferida}} \times 100$$

Análises histológicas

No final do tratamento, os animais foram eutanasiados usando gás dióxido de carbono (CO₂) e amostras de tecido foram removidas ao redor da ferida. As amostras

foram fixadas em solução tampão de formaldeído a 10%, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol e, em seguida, incluídas em parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo manual do tipo Minot (5-7 μ m). Os cortes histológicos foram montados em lâmina, desparafinizados e reidratados. A seguir, o material foi corado com a coloração de hematoxilina-eosina, para análise geral do tecido, e com a coloração de Picrosirius Red para observar a deposição de fibras de colágeno. As imagens histológicas foram obtidas em microscópio óptico convencional Axioplan (Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera digital Evolution MP Color (MediaCybernetics, CE, Canadá) e analisadas pelo programa Q-Capture®.

Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios farmacológicos foram expressos como média $\pm$ erro padrão (n=5). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Tukey. Os resultados descritos como estatisticamente significativos tiveram $p \leq 0,05$.

Resultados e discussão

A fim de propor uma aplicação terapêutica de *K. pinnata* (KP) no tratamento de feridas, duas formulações farmacêuticas foram desenvolvidas neste estudo: uma contendo apenas o flavonoide principal KP isolado da planta e uma segunda contendo extrato bruto de folhas de KP.

O extrato de folhas de KP foi obtido com um rendimento de 5,4% (p/p), resultando em um extrato contendo 2% (p/p) do flavonoide majoritário. A água foi escolhida como solvente para a obtenção do extrato, já que nosso objetivo foi adotar um procedimento de extração semelhante ao utilizado pela população, que se serve da planta em preparações aquosas (sumos, infusões e decocções) para fins medicinais (Costa et al., 2008; Lorenzi & Matos, 2008). Além disso, a água é um solvente de baixo custo, facilmente acessível e atóxico, não gerando resíduos que necessitem de destinação especial, como determinados solventes orgânicos (Chemat et al., 2012).

Um creme não iônico foi preparado como carreador a fim de proporcionar espalhabilidade na pele e hidratação do tecido cicatricial, sem ser oclusivo, de forma a não interferir no processo de cicatrização. A hidratação tem um papel importante na

promoção da reparação de lesões cutâneas (Ousey et al., 2016). A escolha da concentração do extrato de folhas (6% p/p) foi baseada na faixa de concentração usual de formulações cutâneas contendo extratos vegetais (1-10%) (Apsen, 2019; Builders et al., 2013; Cetin et al., 2013; Brasil, 2010). Já a concentração de 0,15% do flavonoide majoritário usada na formulação do creme foi escolhida por ser próxima do teor desse flavonoide no extrato de folhas (2%).

Ambos os cremes exibiram aspecto homogêneo, com características organolépticas aceitáveis, como odor e a cor peculiar de cada agente ativo empregado: o creme contendo extrato de KP apresentou aspecto acastanhado, enquanto o creme contendo flavonoide majoritário KP era levemente amarelado. A análise macroscópica não mostrou alterações nas características organolépticas, odor remanescente, coloração inicial e textura após inspeção visual, durante todo o período do estudo de estabilidade (60 dias) (Tabela 1). Não houve separação de fases, formação de grumos ou precipitados. A densidade também não apresentou variações significativas (variações menores que 1,5%) em relação ao seu valor inicial, para ambos.

Não foi possível avaliar a estabilidade do creme contendo flavonoide majoritário devido à quantidade insuficiente do mesmo. Porém, foi possível verificar o pH e a densidade desse creme no tempo zero: pH 4,53 e densidade 0,9923 g/ml. Adicionalmente, as análises macroscópicas de ambos os cremes não mostraram alteração em suas características organolépticas, mesmo após 180 dias.

Tabela 1: Avaliação da aparência, pH e densidade do creme contendo extrato de folhas de *Kalanchoe pinnata* 6% (p/p) ao longo de 60 dias de estudo em três diferentes condições de armazenamento.

Condições de armazenamento	Tempo (dias)	Aparência	pH	Densidade (g/ml)
Temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C)	0	S/A	4,25	1,0297
	30	S/A	4,07	1,0259
	60	S/A	4,30	1,0260
Refrigeração (5 °C ± 2 °C)	0	S/A	4,25	1,0297
	30	S/A	4,15	1,0269
	60	S/A	4,34	1,0310
Aquecimento (40 °C ± 2 °C)	0	S/A	4,25	1,0297
	30	S/A	4,06	1,0240
	60	S/A	4,22	1,0160

S/A = sem alteração

Ambas as formulações desenvolvidas também apresentaram estabilidade microbiológica (Tabela 2) de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos (Brasil, 2010). A contaminação microbiana pode prejudicar a qualidade e o desempenho de um produto farmacêutico, pois pode causar a mudança de aspecto e danos ao paciente, como complicações cutâneas e outros efeitos adversos. Além disso, microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* não devem estar presentes neste tipo de formulação (Dao et al., 2018).

Tabela 2. Análise microbiológica de cremes contendo extrato de folhas *Kalanchoe pinnata* (KP) e seu flavonoide majoritário

Parâmetro	Creme contendo extrato de KP	Creme contendo flavonoide majoritário	Valores de referência
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente
Fungos e leveduras	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	10 ¹ UFC/g
Bactérias totais	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente

UFC = unidades formadoras de colônia

Vários modelos animais usados para avaliar a eficácia e segurança de formulações farmacêuticas com potencial atividade de cicatrização de feridas cutâneas são relatados na literatura. A escolha de um modelo animal (porco, coelho, camundongo ou rato) dependerá do que se pretende investigar (Ansell et al., 2012; Grada et al., 2018). O modelo de ferida excisional de rato utilizado nesse estudo é um protocolo bem estabelecido (Grada et al., 2018) e se mostrou adequado, considerando-se que nosso principal objetivo foi comparar o potencial de cicatrização de duas formulações em feridas agudas. Ambos os cremes apresentaram resultados positivos e contribuíram favoravelmente para a cicatrização das lesões, quando comparados aos grupos controle. O aspecto das feridas tratadas e o percentual de área cicatrizada ao longo do tratamento são mostrados na **Figura 3**.¹

¹ A figura encontra-se em inglês, uma vez que se trata da figura original apresentada no artigo do **Anexo 1**.

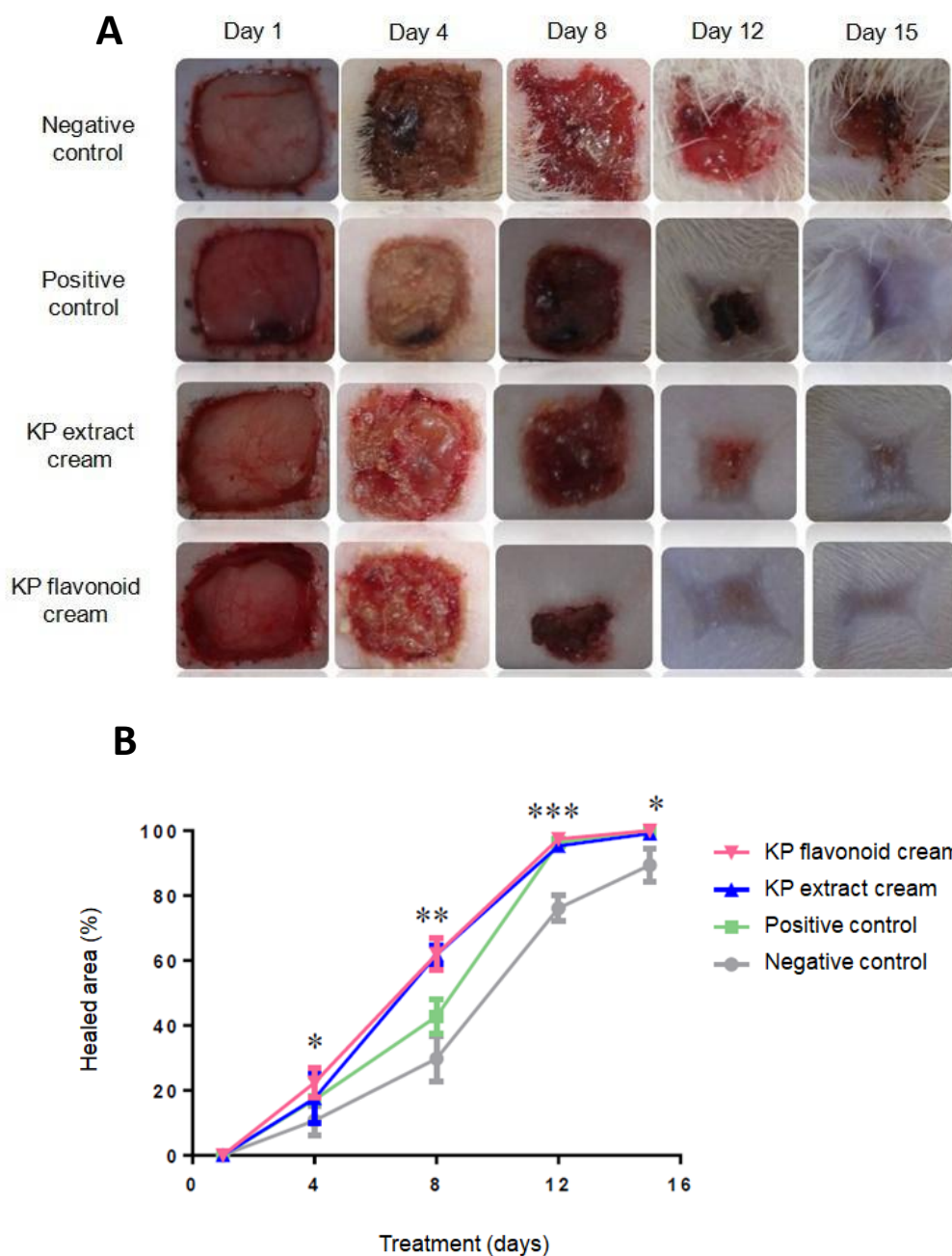


Figura 3. (A) Evolução macroscópica da cicatrização das feridas nos diferentes grupos testados, ao longo do período de tratamento (15 dias consecutivos). As imagens são representativas de cada grupo de amostra. (B) Percentual de área cicatrizada das feridas ao longo de 15 dias de tratamento com as formulações de KP, controles positivos e negativos. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n = 5$). Estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, em relação ao controle negativo.

Desde os primeiros dias foi possível observar diferenças no aspecto das lesões: os grupos tratados com os cremes contendo extrato de folha de KP ou flavonoide majoritário apresentavam feridas mais limpas, sem sinais de inflamação (**Figura 3A**). No 8º dia de tratamento, as diferenças macroscópicas foram marcantes e confirmadas pela análise estatística: os grupos tratados com creme de extrato de folhas de KP e creme com flavonoide majoritário apresentaram cicatrização de $61,7\% \pm 2,8\%$ e $61,9\% \pm 4,9\%$, respectivamente. Nas mesmas condições, o grupo controle positivo obteve $42,8\% \pm 5,2\%$ de cicatrização, enquanto o grupo controle negativo obteve apenas $29,8\% \pm 6,9\%$ (**Figura 3B**).

Macroscopicamente, as lesões dos grupos tratados com as formulações de KP cicatrizaram em menor tempo em relação aos grupos controle (**Figura 3**). No 12º dia, os grupos tratados com creme de extrato de folhas KP e creme com flavonoide majoritário exibiram $95,3\% \pm 1,2\%$ e $97,5\% \pm 0,8\%$ de cicatrização, respectivamente. Nas mesmas condições, as feridas do grupo controle positivo cicatrizaram $96,7\% \pm 0,8\%$, enquanto o grupo controle negativo cicatrizou apenas $76,1\% \pm 3,8\%$ ($p < 0,001$). Até o 15º dia, as feridas de todos os grupos já estavam cicatrizadas, exceto no grupo controle negativo ($p < 0,05$). Portanto, a aplicação tópica de ambos os cremes KP foi capaz de aumentar significativamente a taxa de contração da ferida e reduzir o tempo de reepitelização, em comparação com os grupos controle.

Os resultados histológicos concordam com os observados na avaliação macroscópica das feridas. As feridas tratadas com ambos os cremes de KP (**Figura 4A e 4B**) foram semelhantes ao controle positivo (**Figura 4C**), apresentando melhor resultado em comparação ao controle negativo (**Figura 4D**): reepitelização mais pronunciada, reparo da derme, feixes de colágeno mais espessos e fibras intercaladas com fibroblastos na região reticular. No controle negativo, a reepitelização estava ausente ou incompleta, e fibroblastos abundantes foram observados, sugerindo um tecido mais imaturo (**Figura 4D**). Além disso, os tratamentos com os cremes de KP e o com o medicamento do controle positivo permitiram a regeneração dos apêndices da pele (folículos pilosos e glândulas sebáceas). Seções histológicas coradas com Picrosirius Red corroboraram os resultados das análises histológicas utilizando coloração de hematoxilina-eosina: ambas as formulações de extrato de KP e de seu flavonoide (**Figura 5A e 5B**), assim como o controle positivo (**Figura 5C**), exibiram feixes mais espessos e densos de fibras de colágeno em comparação ao controle negativo (**Figura 5D**).

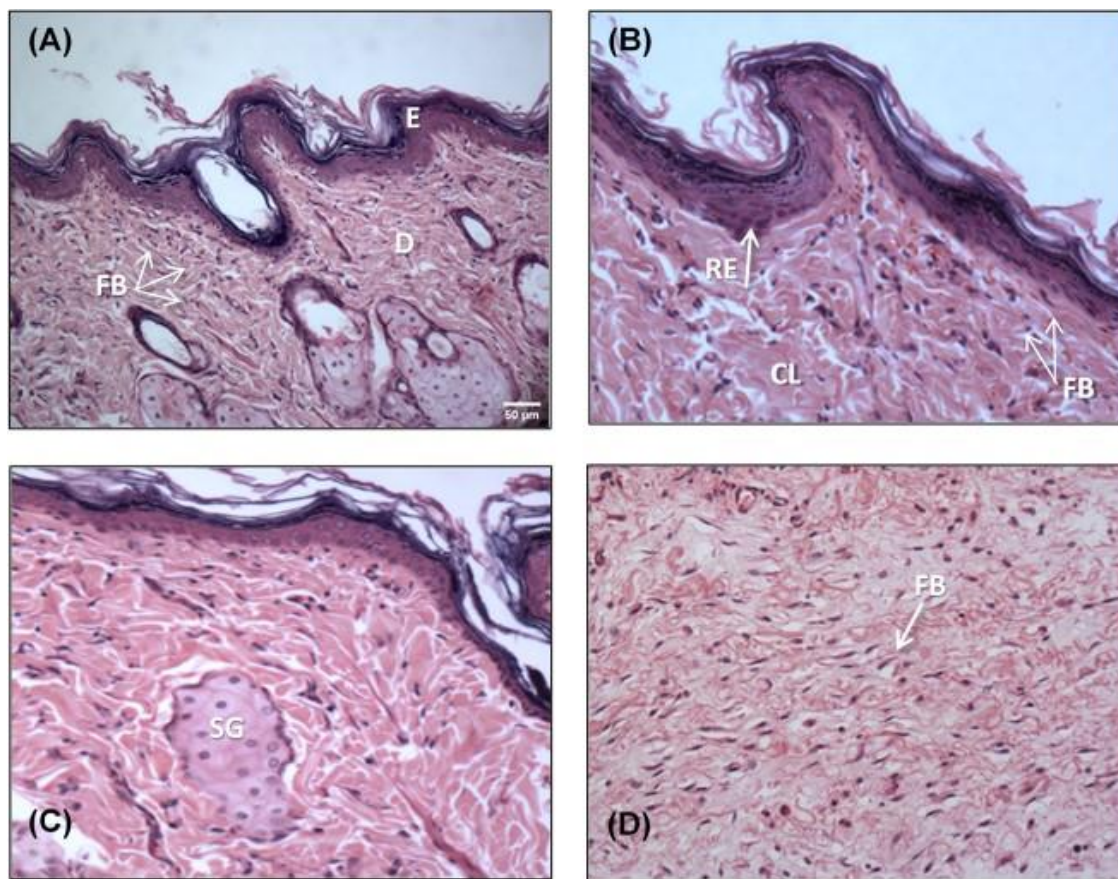


Figura 4. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido cicatricial de feridas de pele de rato tratadas com creme de extrato de folhas de KP 6% (A), creme com flavonoide majoritário de KP 0,15% (B), creme comercial contendo neomicina e bacitracina - controle positivo (C) e o veículo - controle negativo (D). Observe em (B) a presença de zona de reepitelização. E: epiderme; D: derme; RE: reepitelização; FB: fibroblastos; CL: colágeno; SG: glândula sebácea. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 50 µm (aumento de 200X).

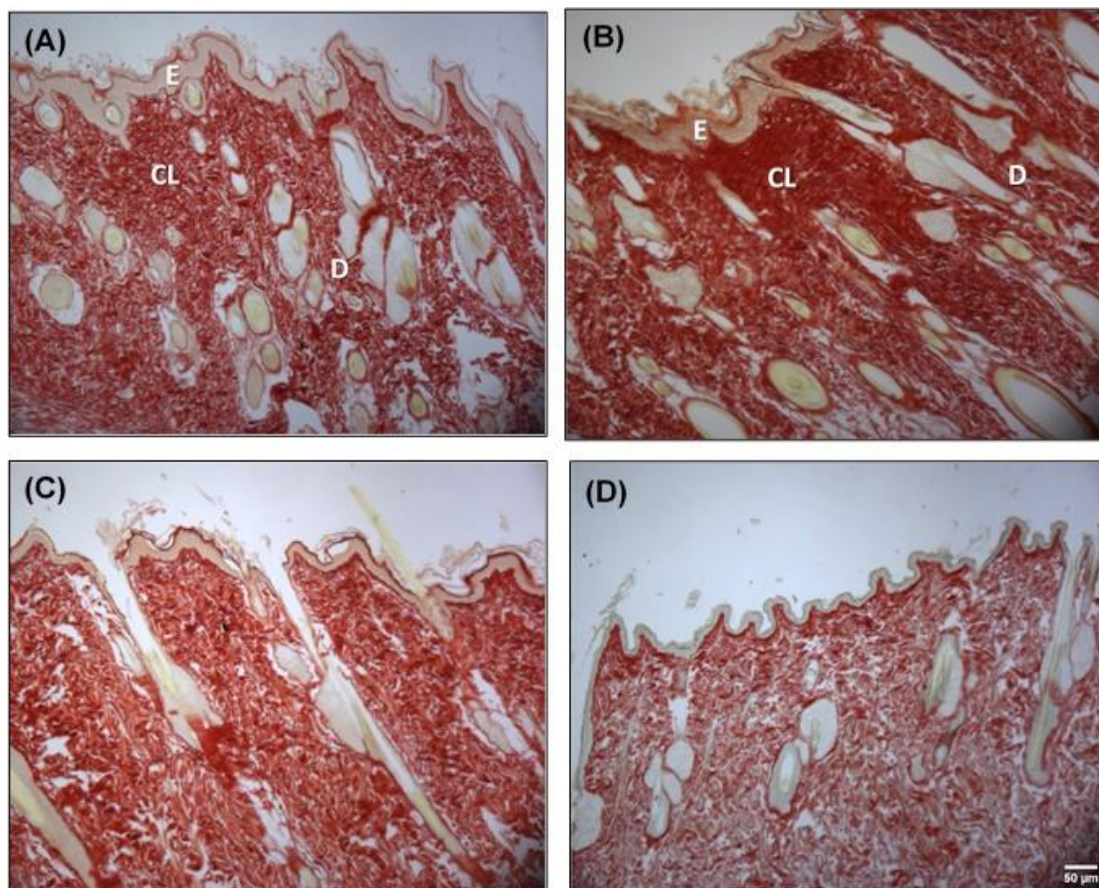


Figura 5. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido cicatricial de feridas de pele de rato tratadas com creme de extrato de folhas de KP 6% (A), creme com flavonoide majoritário de KP 0,15% (B), creme comercial contendo neomicina e bacitracina - controle positivo (C) e o veículo - controle negativo (D). Observe que as fibras de colágeno são mais abundantes e têm coloração mais intensa nas feridas tratadas com cremes de KP e com controle positivo (A, B e C, respectivamente). Observe também que a epiderme no controle negativo (D) é mais fina e o estrato córneo não pode ser visto com a mesma ampliação. E: epiderme; D: derme; CL: colágeno; SG: glândula sebácea. Coloração: Picrosirius. Barra de escala: 50 µm. (aumento de 100X).

Os agentes cicatrizantes podem atuar nas três etapas principais de cicatrização de feridas, as quais envolvem a interação entre as células e a matriz celular: inflamação (de 0 a 3 dias após a lesão), proliferação celular (de 3 a 12 dias após a lesão) e remodelação (última fase) (Kumar et al., 2007).

Normalmente, uma lesão pode ser acompanhada por dor, vermelhidão e edema tecidual - sintomas clássicos de inflamação causados pela liberação de prostaglandinas, leucotrienos e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Portanto, a atividade anti-inflamatória de alguns extratos vegetais e seus componentes, assim como a atividade antioxidante, são propriedades favoráveis ao processo de cicatrização. Os antioxidantes, compostos capazes de capturar os radicais livres, desempenham um papel

importante na cicatrização de feridas. Eles podem remover EROs ou ERNs formados por neutrófilos no local da lesão, protegendo os fibroblastos e demais células do dano oxidativo (Houghton et al., 2005). Assim, os compostos antioxidantes configuram importantes agentes no tratamento de feridas, uma vez que o aumento no status antioxidante é importante na recuperação de lesões (Kumar et al., 2007; Narendhirakannan et al., 2012).

As feridas também são passíveis de infecção, principalmente por bactérias, visto que constituem portas de entrada para microrganismos patogênicos. E feridas infectadas demoram mais para cicatrizar, produzindo, geralmente, exsudatos e toxinas, com destruição concomitante de células regenerativas. Assim, os agentes antimicrobianos utilizados na medicina tradicional poderiam prevenir a ocorrência de infecção em feridas, contribuindo para o processo cicatricial (Houghton et al., 2005). Desta forma, as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana dos fitoterápicos são importantes nas diferentes etapas de cicatrização (Pazyar et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram a ação cicatrizante de extratos de *K. pinnata*. Extratos etanólicos de folhas reduziram em torno de 86% da área de feridas (valor comparável ao controle positivo), após 11 dias, em modelo de ferida por excisão em ratos (Nayak et al., 2010). No entanto, o método de extração empregado nesse estudo foi diferente do nosso, o que pode acarretar uma diferença na composição química do extrato e, conseqüentemente, na sua atividade. Em diversos estudos farmacológicos de plantas com ação cicatrizante disponíveis na literatura, foram avaliados os efeitos de extratos obtidos com solventes orgânicos. No entanto, as plantas são comumente usadas em veículos aquosos. Assim, existe uma divergência entre a composição química dos extratos avaliados e a dos extratos tradicionalmente empregados (Kumar et al., 2007).

Levando em consideração estudos realizados com extratos aquosos, quando extratos de folhas de KP foram aplicados diretamente em feridas observou-se cicatrização em torno de 92% no 12º dia (Khan et al., 2004), valor ligeiramente inferior ao encontrado em nosso estudo, no qual o extrato foi incorporado em um creme.

Mais recentemente, Lebedeva e col. demonstraram a atividade antimicrobiana e cicatrizante de feridas de um extrato aquoso de KP selvagem em um modelo de feridas infectadas com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em ratos. Em comparação com o transgênico *K. pinnata* + cecropin P1 (CceP1) avaliado no mesmo estudo, o extrato de *K. pinnata* selvagem apresentou maior aceleração da granulação da ferida e maior epitelização marginal do que o extrato da espécie transgênica. Os autores

sugeriram que as propriedades imunomoduladoras de KP são responsáveis por este melhor desempenho (Lebedeva et al., 2017).

De fato, extratos de folhas de KP já demonstraram atividades imunomoduladora (Da-Silva et al., 1999; Da Silva et al., 1995) e antimicrobiana (Akinpelu, 2000; Biswas et al., 2012; Nwadinigwe, 2011; Okwu & Nnamdi, 2011). Além disso, é importante destacar que atividades biológicas adicionais, como antioxidante (Bogucka-Kocka et al., 2018; Nascimento et al., 2013; Phatak & Hendre, 2014) e anti-inflamatória (Afzal et al., 2012; Chibli et al., 2014; De Araújo et al., 2019; Gupta et al., 2010; Matthew et al., 2013) também foram descritas para extratos de folhas de KP.

Substâncias naturais com atividade cicatrizante incluem alcaloides, terpenos e fenólicos (taninos, flavonoides e ácidos fenólicos) (Budovsky et al., 2015). No presente estudo, não apenas a atividade cicatrizante do creme contendo extrato aquoso de folha de KP foi demonstrada, mas também descrevemos o efeito cicatrizante do creme contendo o flavonoide majoritário de KP, fornecendo fortes evidências de que este componente é o principal responsável por tal atividade na planta.

Em relação a essa substância, sua ação antioxidante, relatada anteriormente por nosso grupo, provavelmente contribuiu favoravelmente para o efeito terapêutico aqui relatado. O flavonoide majoritário de KP exibiu um valor de CE_{50} de 1,41 $\mu\text{g/ml}$ em ensaio *in vitro* com o radical DPPH, mostrando-se cerca de 17 vezes mais ativo que o extrato (Nascimento et al., 2013). Este achado destacou o alto potencial desse flavonoide no combate a radicais livres.

A atividade anti-inflamatória deste flavonoide também foi demonstrada por nosso grupo em ensaios *in vivo*. O flavonoide majoritário de KP foi capaz de reduzir a migração de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina (DI_{50} 2,0 mg/kg) e o edema de ouvido induzido por óleo de cróton (DI_{50} 0,76 mg/kg). Essa substância também reduziu a concentração de $\text{TNF-}\alpha$ nos exsudatos pleurais e inibiu as enzimas COX-1 e COX-2 (Ferreira et al., 2014). O efeito anti-inflamatório apresentado pelo flavonoide majoritário pode explicar os resultados positivos obtidos para o creme contendo este fenólico no ensaio de cicatrização de feridas conduzido pela nossa equipe.

Durante o mesmo período de tratamento, ambos os cremes de KP forneceram resultados comparáveis ou até melhores do que o controle positivo. Esses resultados, acrescidos do fato de tudo indicar que o flavonoide majoritário seja a molécula bioativa principal, o uso de extratos brutos enriquecidos neste flavonoide poderia ser interessante,

pois suprimiria a etapa trabalhosa, custosa e demorada para o isolamento dessa substância.

Outro destaque importante em favor de um creme à base de extrato de folha de *K. pinnata* para cicatrização de feridas é a facilidade de acesso a esse material vegetal. Além da ampla distribuição desta espécie ao redor do mundo, a propagação assexuada é uma característica marcante de muitas espécies do gênero *Kalanchoe* (González de León et al., 2016). A combinação de reprodução sexuada e assexuada em *K. pinnata* facilita sua propagação (González de León et al., 2016; Jaiswal & Sawhney, 2006), o que lhe confere excelente vantagem para emprego como matéria-prima e/ou fonte de compostos bioativos para produção de fitomedicamentos.

Neste contexto, a composição química do extrato aquoso de folhas de KP foi avaliada por LC-MS (**Figura 6, Tabela 3**). Foi possível identificar, além do flavonoide majoritário de KP [quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo], outros flavonoides glicosídicos, além de ácidos orgânicos. Embora outros fenólicos minoritários estejam presentes no extrato das folhas de *K. pinnata*, o flavonoide majoritário é, como esperado, o composto fenólico mais abundante neste extrato. Tal composta foi testado em uma concentração 40 vezes menor que o extrato de folhas de KP neste estudo, apresentando resultados semelhantes. Isso indica que tal flavonoide é provavelmente o principal responsável pela atividade cicatrizante do extrato de KP.

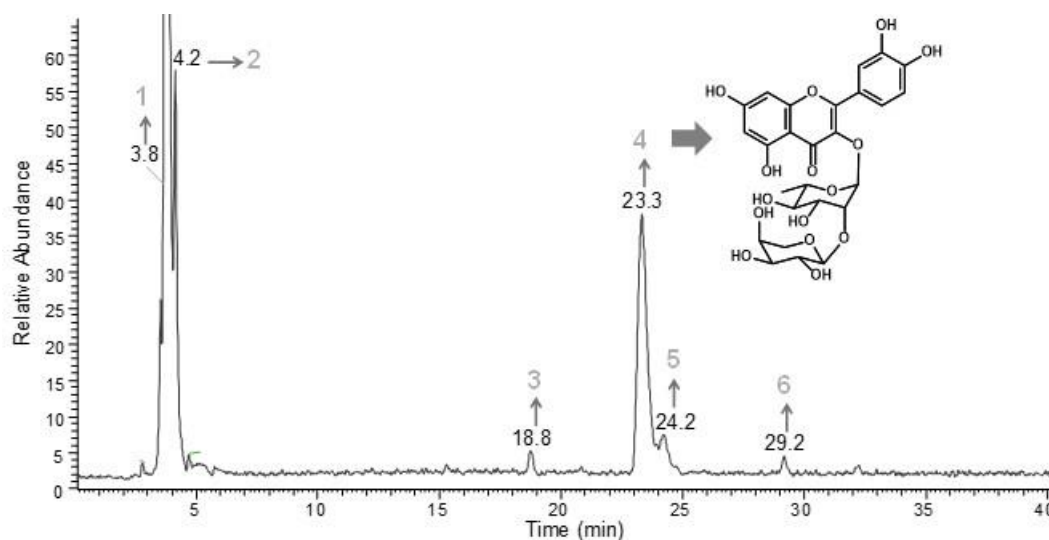


Figura 6. Cromatograma base peak do extrato aquoso de folhas de *Kalanchoe pinnata* (2 mg/ml) obtido por CLAE-ESI-EM/EM no modo negativo.

Tabela 3. Propriedades cromatográficas e espectroscópicas de substâncias detectadas no extrato aquoso de folhas de *Kalanchoe pinnata* (2 mg/ml) analisado por CLAE-ESI-EM/EM no modo negativo.

Pico	Tr (min)	[M-H] ⁻	Fragmentos	Estrutura proposta
1	3,8	133	115	Ácido málico
2	4,2	191	173, 129, 111	Ácido quínico
3	18,8	595	316, 287, 271	Miricetina- <i>O</i> -desoxi-hexosídeo- <i>O</i> -pentosídeo ¹
4	23,3	579	447, 301, 300 271, 255	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-arabinosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnosídeo (flavonoide majoritário)*
5	24,2	447	301, 300, 271, 255	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo (quercitrina)*
6	29,2	563	431, 285, 284, 255	Kaempferol- <i>O</i> -desoxi-hexosídeo- <i>O</i> -pentosídeo ²

¹ Possivelmente miricetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnopiranoídeo; ² Possivelmente kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnopiranosídeo (kapinnatosídeo) (Fürer et al., 2016; Wishart et al., 2018).

*Confirmados por comparação com padrão.

Existem vários relatos sobre a atividade cicatrizante de glicosídeos de flavonóis, entre os quais podem-se destacar rutina, quercitrina, isoquercitrina e miricitrina (Asfour et al., 2017; Süntar et al., 2010; Moghadam et al., 2017). Tais achados indicam que os flavonóis glicosídicos detectados no extrato aquoso de folhas de KP poderiam, juntamente com o flavonoide majoritário, contribuir para a atividade cicatrizante observada.

Conclusão

A aplicação tópica de ambos os cremes de KP aumentou significativamente a taxa de contração das feridas e reduziu o tempo de reepitelização em apenas uma semana, em comparação com grupos controle e estudos semelhantes na literatura. Portanto, o uso de extratos de KP constitui potencial estratégia na obtenção de uma alternativa acessível para o tratamento de feridas, principalmente tendo em vista a facilidade de cultivo e extração da planta e de preparo dos cremes, bem como os resultados promissores aqui relatados. Nesse estudo *in vivo*, foi demonstrado pela primeira vez o importante papel do flavonoide majoritário de KP na cicatrização de feridas. Considerando os resultados semelhantes dos dois cremes, o uso do extrato bruto de KP, no qual esse flavonoide é a principal substância fenólica, poderia ser mais lucrativo e menos custoso. Nossos resultados corroboram o uso popular das folhas de *K. pinnata* para o tratamento de feridas e reforçam o potencial de aplicação terapêutica dessa planta na atenção básica à saúde.

Referências

- AFZAL, M., GUPTA, G., KAZMI, I., RAHMAN, M., AFZAL, O., ALAM, J., HAKEEM, K. R., PRAVEZ, M., GUPTA, R. & ANWAR, F. (2012). Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia* **83**, 853–858.
- AGYARE, C., BOAKYE, Y. D., BEKOE, E. O., HENSEL, A., DAPAAH, S. O. & APPIAH, T. (2016). Review: African medicinal plants with wound healing properties. *Journal of Ethnopharmacology* **177**, 85–100.
- AKINPELU, D. A. (2000). Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia* **71**, 193–194.
- ANDRADE, C. C. D., ALMEIDA, C. F. DOS S. C. DE, PEREIRA, W. E., ALEMÃO, M. M., BRANDÃO, C. M. R. & BORGES, E. L. (2016). Costs of topical treatment of pressure ulcer patients. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* **50**, 295–301.
- ANSELL, D. M., HOLDEN, K. A. & HARDMAN, M. J. (2012). Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Experimental Dermatology* **21**, 581–585.
- APSEN (2019). FITOSCAR® *Stryphnodendron adstringens*_(Mart.) Corville.

- DE ARAÚJO, E. R. D., FÉLIX-SILVA, J., XAVIER-SANTOS, J. B., FERNANDES, J. M., GUERRA, G. C. B., DE ARAÚJO, A. A., ARAÚJO, D. F. DE S., DE SANTIS FERREIRA, L., DA SILVA JÚNIOR, A. A., FERNANDES-PEDROSA, M. DE F. & ZUCOLOTO, S. M. (2019). Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **113**, 108721.
- ASFUR, M. H., ELMOTASEM, H., MOSTAFA, D. M. & SALAMA, A. A. A. (2017). Chitosan based pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* **534**, 325–338.
- ATIVUS FARMACEUTICA (2016). Aloax (*Aloe vera*). <https://drogariaeconomais.com.br/BACKOFFICE/Uploads/Bula/1186102400023.pdf>.
- BISWAS, S. K., CHOWDHURY, A., RAIHAN, S. Z., MUHIT, M. A., AKBAR, M. A. & MOWLA, R. (2012). Phytochemical investigation with assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of chloroform extract of the leaves of *Kalanchoe pinnata*. *American Journal of Plant Physiology* **7**, 41–46.
- BOGUCA-KOCKA, A., ZIDORN, C., KASPRZYCKA, M., SZYMCAK, G. & SZEWCZYK, K. (2018). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. *Saudi Journal of Biological Sciences* **25**, 622–630. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X16000395>.
- BOITEAU, P. & ALORGE-BOITEAU, L. (1995). *Kalanchoe (Crassulaceae) de Madagascar, Systématique, écophysiologie et phytochimie*. Paris: Karthala.
- BRASIL (2010). *Farmacopeia Brasileira 5ª Edição*. 5th ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.
- BUDOVSKY, A., YARMOLINSKY, L. & BEN-SHABAT, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **23**, 171–183.
- BUILDERS, P., KABELE-TOGE, B., BUILDERS, M., CHINDO, B., ANWUNOBI, P. & ISIMI, Y. (2013). Wound healing potential of formulated extract from *Hibiscus sabdariffa* Calyx. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **75**, 45.
- CAMPOS, A. A. G., MORE, L. F. & ARRUDA, S. S. (2008). Protocolo de Cuidados de Feridas. Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde. Florianópolis: IOESC.

- CAWICH, S. O., HARNARAYAN, P., BUDHOORAM, S., BOBB, N. J., ISLAM, S. & NARAYNSINGH, V. (2014). Wonder of Life (*Kalanchoe pinnata*) leaves to treat diabetic foot infections in Trinidad & Tobago: A case control study. *Tropical Doctor* **44**, 209–213.
- CETIN, E. O., YESIL-CELIK TAS, O., CAVUSOGLU, T., DEMIREL-SEZER, E., AKDEMIR, O. & UYANIKGIL, Y. (2013). Incision wound healing activity of pine bark extract containing topical formulations: A study with histopathological and biochemical analyses in albino rats. *Pharmazie* **68**, 75–80.
- CHEMAT, F., VIAN, M. A. & CRAVOTTO, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 8615–8627.
- CHIBLI, L. A., RODRIGUES, K. C. M., GASPARETTO, C. M., PINTO, N. C. C., FABRI, R. L., SCIO, E., ALVES, M. S., DEL-VECHIO-VIEIRA, G. & SOUSA, O. V. (2014). Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* **154**, 330–338.
- COELHO-FERREIRA, M. (2009). Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* **126**, 159–175.
- COSTA, S. S., MUZITANO, M. F., CAMARGO, L. M. M. & COUTINHO, M. A. S. (2008). Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications* **3**, 1–14.
- COUTINHO, M. A. S., MUZITANO, M. F., CRUZ, E. A., BERGONZI, M. C., KAISER, C. R., TINOCO, L. W., BILIA, A. R., VINCIERIC, F. F., ROSSI-BERGMANN, B. & COSTA, S. S. (2012). Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a rich source of T cell-suppressive flavonoids. *Natural product communications* **7**, 175–8.
- CRUZ, E. A., DA-SILVA, S. A. G., MUZITANO, M. F., SILVA, P. M. R., COSTA, S. S. & ROSSI-BERGMANN, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology* **8**, 1616–1621.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576908002063>.
- DA-SILVA, S. A., COSTA, S. S. & ROSSI-BERGMANN, B. (1999). The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. *Parasitology* **118**, 575–582.

- DAO, H., LAKHANI, P., POLICE, A., KALLAKUNTA, V., AJJARAPU, S. S., WU, K.-W., PONKSHE, P., REPKA, M. A. & NARASIMHA MURTHY, S. (2018). Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. *AAPS PharmSciTech* **19**, 60–78.
- DZIAŁO, M., MIERZIAK, J., KORZUN, U., PREISNER, M., SZOPA, J. & KULMA, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International journal of molecular sciences* **17**, 160.
- FAN, K., TANG, J., ESCANDON, J. & KIRSNER, R. S. (2011). State of the art in topical wound-healing products. *Plastic and Reconstructive Surgery* **127**, 44S-59S.
- FERREIRA, R. T., COUTINHO, M. A. S., MALVAR, D. D. C., COSTA, E. A., FLORENTINO, I. F., COSTA, S. S. & VANDERLINDE, F. A. (2014). Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2014**, 429256.
- FÜRER, K., SIMÕES-WÜST, A., VON MANDACH, U., HAMBURGER, M. & POTTERAT, O. (2016). *Bryophyllum pinnatum* and related species used in anthroposophic medicine: constituents, pharmacological activities, and clinical efficacy. *Planta Medica* **82**, 930–941.
- GONZÁLEZ DE LEÓN, S., HERRERA, I. & GUEVARA, R. (2016). Mating system, population growth, and management scenario for *Kalanchoe pinnata* in an invaded seasonally dry tropical forest. *Ecology and Evolution* **6**, 4541–4550.
- GRADA, A., MERVIS, J. & FALANGA, V. (2018). Research techniques made simple: Animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, 2095-2105.e1.
- GUPTA, R., LOHANI, M. & ARORA, S. (2010). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts / fractions of *Bryophyllum pinnatum* Saliv . Syn. **3**, 16–18.
- HOUGHTON, P. J., HYLANDS, P. J., MENSAH, A. Y., HENSEL, A. & DETERS, A. M. (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 100–107.
- JAISWAL, S. & SAWHNEY, S. (2006). Correlation of epiphyllous bud differentiation with foliar senescence in crassulacean succulent *Kalanchoe pinnata* as revealed by thidiazuron and ethrel application. *Journal of Plant Physiology* **163**, 717–722.
- KHAN, M., PATIL, P. A. & SHOBHA, J. C. (2004). Influence of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) leaf extract on wound healing in albino rats. *Journal of Natural Remedies* **4**, 41–46.

- KUMAR, B., VIJAYAKUMAR, M., GOVINDARAJAN, R. & PUSHPANGADAN, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing—Exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology* **114**, 103–113.
- LEBEDEVA, A. A., ZAKHARCHENKO, N. S., TRUBNIKOVA, E. V., MEDVEDEVA, O. A., KUZNETSOVA, T. V., MASGUTOVA, G. A., ZYLKOVA, M. V., BURYANOV, Y. I. & BELOUS, A. S. (2017). Bactericide, immunomodulating, and wound healing properties of transgenic *Kalanchoe pinnata* synergize with antimicrobial peptide cecropin P1 in vivo. *Journal of Immunology Research* **2017**, 1–8.
- LEI, Z.-Y., CHEN, J.-J., CAO, Z.-J., AO, M.-Z. & YU, L.-J. (2019). Efficacy of *Aeschynomene indica* L. leaves for wound healing and isolation of active constituent. *Journal of Ethnopharmacology* **228**, 156–163.
- LIMA, A. F. C., CASTILHO, V., BAPTISTA, C. M. C., ROGENSKI, N. M. B. & ROGENSKI, K. E. (2016). Custo direto dos curativos de úlceras por pressão em pacientes hospitalizados. *Revista Brasileira de Enfermagem* **69**, 290–297.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. (2008). *Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Instituto Plantarum.
- MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, É. P. & MANDELBAUM, M. H. S. (2003). Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **78**, 525–542.
- MATTHEW, S., JAIN, A. K., JAMES, M., MATTHEW, C. & BHOWMIK, D. (2013). Analgesic And Anti-Inflammatory Activity of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Journal of Medicinal Plants Studies* **1**, 24–28.
- MAVER, T., MAVER, U., STANA KLEINSCHKE, K., SMRKE, D. M. & KREFT, S. (2015). A review of herbal medicines in wound healing. *International Journal of Dermatology* **54**, 740–751.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2.
- MOGHADAM, S., EBRAHIMI, S., SALEHI, P., MORIDI FARIMANI, M., HAMBURGER, M. & JABBARZADEH, E. (2017). Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* **22**, 1501.
- MUZITANO, M. F., CRUZ, E. A., DE ALMEIDA, A. P., DA SILVA, S. A. G., KAISER, C. R., GUETTE, C., ROSSI-BERGMANN, B. & COSTA, S. S. (2006). Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica* **72**, 81–83. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2005-873183>.

- MUZITANO, M. F., TINOCO, L. W., GUETTE, C., KAISER, C. R., ROSSI-BERGMANN, B. & COSTA, S. S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* **67**, 2071–2077.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206003700>.
- NARENDHIRAKANNAN, R. T., NIRMALA, J. G., CAROLINE, A., LINCY, S., SAJ, M. & DURAI, D. (2012). Evaluation of antibacterial, antioxidant and wound healing properties of seven traditional medicinal plants from India in experimental animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**, S1245–S1253.
- NASCIMENTO, L. B. DOS S. (2018). ‘Otimização da extração aquosa e da produção, por eliciação com radiação UV-B e restrição hídrica, de Flavonóides bioativos de *Kalanchoe Pinnata* LAM. PERS. (CRASSULACEAE).’ Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- NASCIMENTO, L. B. DOS S., DE AGUIAR, P. F., LEAL-COSTA, M. V., COUTINHO, M. A. S., BORSODI, M. P. G., ROSSI-BERGMANN, B., TAVARES, E. S. & COSTA, S. S. (2018). Optimization of aqueous extraction from *Kalanchoe pinnata* leaves to obtain the highest content of an anti-inflammatory flavonoid using a response surface model. *Phytochemical Analysis* **29**, 308–315.
- NASCIMENTO, L. B. DOS S., LEAL-COSTA, M. V., MENEZES, E. A., LOPES, V. R., MUZITANO, M. F., COSTA, S. S. & TAVARES, E. S. (2015). Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **148**, 73–81.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134415000883>.
- NASCIMENTO, L. B. S., LEAL-COSTA, M. V., COUTINHO, M. A. S., MOREIRA, N. D. S., LAGE, C. L. S., BARBI, N. D. S., COSTA, S. S. & TAVARES, E. S. (2013). Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. *Photochemistry and Photobiology* **89**, 391–399.
- NAYAK, B. S., MARSHALL, J. R. & ISITOR, G. (2010). Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf--a preliminary study. *Indian journal of experimental biology* **48**, 572–6.
- NOGUEIRA CORTEZ, D., TEIXEIRA MORAES, J., RODRIGUES FERREIRA, I., LIBÉRIO SILVA, E. & MOURA LANZA, F. (2020). Custos do tratamento de lesões cutâneas na Atenção Primária à Saúde. *ESTIMA, Brazilian Journal of Enterostomal Therapy*.
<https://www.revistaestima.com.br/index.php/estima/article/view/824/pdf>.

- NWADINIGWE, A. O. (2011). Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of *Bryophyllum pinnatum* Kurz (Crassulaceae). *African Journal of Biotechnology* **10**, 16342–16346.
- OKWU, D. E. & NNAMDI, F. U. (2011). Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **3**, 1–10.
- OUSEY, K., CUTTING, K. F., ROGERS, A. A. & RIPPON, M. G. (2016). The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *Journal of Wound Care* **25**, 122–130.
- PAZYAR, N., YAGHOOBI, R., RAFIEE, E., MEHRABIAN, A. & FEILY, A. (2014). Skin wound healing and phytomedicine: A review. *Skin Pharmacology and Physiology* **27**, 303–310.
- PEREIRA, R. F. & BÁRTOLO, P. J. (2016). Traditional therapies for skin wound healing. *Advances in wound care* **5**, 208–229.
- PHATAK, R. S. & HENDRE, A. S. (2014). Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP* **2**, 32–35.
- ROCHA, D. DE M., BEZERRA, S. M. G., OLIVEIRA, A. C. DE, SILVA, J. S., RIBEIRO, Í. A. P. & NOGUEIRA, L. T. (2018). Cost of topical therapy in patients with pressure ulcers. *Journal of Nursing UFPE online* **12**, 2555–2563.
- SCHMIDT, C., FRONZA, M., GOETTERT, M., GELLER, F., LUIK, S., FLORES, E. M. M., BITTENCOURT, C. F., ZANETTI, G. D., HEINZMANN, B. M., LAUFER, S. & MERFORT, I. (2009). Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of ethnopharmacology* **122**, 523–32.
- SERAFINI, M. R., GUIMARAES, A. G., QUINTANS-JUNIOR, L. J., NUNES, P. S., MATOS, I. G., SARAVANAN, S. & ARAUJO, A. A. DE S. (2015). Recent patents on medicinal plants/natural products as a therapeutic approach to wounds and burns healing. *Recent Patents on Biotechnology* **8**, 231–239.
- DA SILVA, S. A. G., COSTA, S. S., MENDONÇA, S. C. F., SILVA, E. M., MORAES, V. L. G. & ROSSI-BERGMANN, B. (1995). Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica* **60**, 201–210.

- SÜNTAR, I. P., AKKOL, E. K., YALÇIN, F. N., KOCA, U., KELEŞ, H. & YESILADA, E. (2010). Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal of Ethnopharmacology* **129**, 106–114.
- SUPRAPTO, A. K., TIH, F. & EVACUASIAN, E. (2015). Effect of methanolic extract in ointment and powder of *Kalanchoe pinnata* (Lamk) leaf in ointment towards incision wound healing in mice. *Journal of Medicine and Health* **1**, 12–19.
- TATSIMO, S. J. N., TAMOKOU, J. D. D., HAVYARIMANA, L., CSUPOR, D., FORGO, P., HOHMANN, J., KUIATE, J.-R. & TANE, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes* **5**, 158.
<https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-158>.
- WISHART, D. S., FEUNANG, Y. D., MARCU, A., GUO, A. C., LIANG, K., VÁZQUEZ-FRESNO, R., SAJED, T., JOHNSON, D., LI, C., KARU, N., SAYEEDA, Z., LO, E., ASSEMPOUR, N., BERJANSKII, M., SINGHAL, S., ARNDT, D., LIANG, Y., BADRAN, H., GRANT, J., SERRA-CAYUELA, A., LIU, Y., MANDAL, R., NEVEU, V., PON, A., KNOX, C., WILSON, M., MANACH, C. & SCALBERT, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research* **46**, D608–D617.

SHORT COMMUNICATION



Wound healing cream formulated with *Kalanchoe pinnata* major flavonoid is as effective as the aqueous leaf extract cream in a rat model of excisional wound

Marcela Araújo Soares Coutinho^{a*}, Livia Marques Casanova^a, Luana Beatriz dos Santos Nascimento^b, Diogo Leal^a, Celia Palmero^c, Helena Keiko Toma^d, Elisabete Pereira dos Santos^d, Luiz Eurico Nasciutti^c and Sônia Soares Costa^a

^aInstituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^bInstituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^cInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^dFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Leaves of *Kalanchoe pinnata* are used worldwide for healing skin wounds. This study aimed to develop and compare two creams containing a leaf aqueous extract of *K. pinnata* (KP; 6%) and its major flavonoid [quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside] (0.15%). Both creams were topically evaluated in a rat excision model for 15 days. On the 12th day, groups treated with KP leaf-extract and KP major flavonoid creams exhibited $95.3 \pm 1.2\%$ and $97.5 \pm 0.8\%$ of healing, respectively (positive control = $96.7 \pm 0.8\%$; negative control = $76.1 \pm 3.8\%$). Both resulted in better re-epithelialization and denser collagen fibres. Flavonol glycosides are the main phenolics in KP leaf-extract according to HPLC-ESI-MS/MS analysis. KP major flavonoid plays a fundamental role in the wound healing. The similar results found for both creams indicate that the use of KP crude extract should be more profitable than the isolated compound.

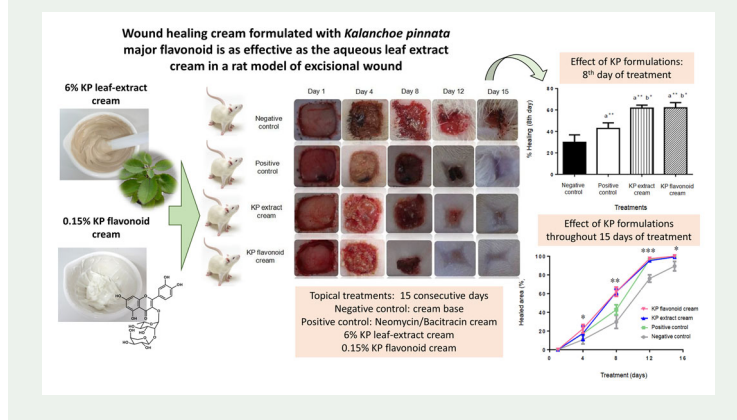
ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2020

Accepted 16 August 2020

KEYWORDS

Bryophyllum pinnatum; Crassulaceae; skin wound healing; pharmaceutical formulations; phytotherapy; quercetin diglycoside; anti-inflammatory



CONTACT Sônia Soares Costa ✉ sscosta@ipn.ufrj.br; sscostabh@gmail.com

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1817012>.

*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro (Maracanã), Rio de Janeiro, RJ 20270-021, Brazil.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

Wounds, burns, ulcers and bedsores represent a high social and economic burden, especially to the global health agencies. Topical products currently used for healing, mainly creams and ointments containing antimicrobial agents and proteolytic enzymes, have different targets in the lesion, acting on distinct stages of the cicatricial process (Fan et al. 2011).

The healing process is a complex event, involving several cellular and biochemical answers. In particular, chemotactic factors help in the recruitment of fibroblasts, inflammatory (macrophages and neutrophils) and endothelial cells in the injured area. While macrophages act on the phagocytosis of bacteria and cell fragments, as well as on the production of chemotactic factors (stimulus to the formation of granulation tissue), the keratinocytes are involved in the re-epithelialization. Additionally, fibroblasts synthesize proteoglycans, glycosaminoglycans and collagen, which are important for tissue repair (Velnar et al. 2009; Bielefeld et al. 2013).

The products commonly applied in wound-healing, although effective, often have side effects and can induce resistance of some microorganisms, in addition to having a high cost for low-income people. Medicinal plants can be a cost-effective alternative (Pereira and Bártolo 2016).

Leaves from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. [syn. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken; KP] (Crassulaceae), a phenolic-rich medicinal plant, are used worldwide as cataplasm or compress to treat skin wounds and inflammatory conditions, and for this reason were chosen in this study (Coelho-Ferreira 2009; Cawich et al. 2014). It is important to emphasize that the taxonomy of this species is not completely resolved (Smith and Figueiredo 2018). Both *Kalanchoe pinnata* and *Bryophyllum pinnatum* can be considered accepted names according to different plant taxonomy databases (The Plant List 2013; Stevens 2017; IPNI 2020; Tropicos.org 2020).

K. pinnata integrates the National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System of Brazil (RENISUS), together with other 70 plant species used in folk medicine with scientific evidence for health benefits (Ministério da Saúde 2009). This species has been extensively studied in our laboratories in order to identify its potentially therapeutic components, majorly quercetin glycosylated flavonoids (Costa et al. 2008; Coutinho et al. 2012; dos Santos Nascimento et al. 2018).

The major flavonoid of *K. pinnata* is an unusual quercetin glycoside – quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside – that can be considered a chemical marker for the species (dos Santos Nascimento et al. 2018). We previously demonstrated its *in vivo* antinociceptive, antiedematogenic and anti-inflammatory effects (Ferreira et al. 2014).

Considering the need for more economical alternatives for wound treatment, the importance of *K. pinnata* (KP) to the Brazilian Unified Health System (SUS), the pharmacological profile of *K. pinnata* as well as the anti-inflammatory activity of its major flavonoid, the aim of this study was to develop and to compare two wound healing formulations in a rat excisional-wound model: one containing a chemically characterized KP-leaf extract and other only with KP major flavonoid.

2. Results and discussion

KP leaf-extract was obtained with a 5.4% (w/w) yield by heating crushed fresh leaves for 30 min with distilled water 20% (w/v) at 50 °C – 60 °C. This extract contained 2% (w/w) of KP major flavonoid. Water was used for extraction to mimic the popular use of the plant (juices, infusions, and decoctions). In addition, water is a low cost, easily accessible and non-toxic solvent (Chemat et al. 2012).

Both formulations were prepared in a non-ionic cream base: KP leaf-extract cream at 6% (w/w), according the usual concentration range of topical plant formulations (Apsen, 2019; Brasil 2010), and KP major flavonoid cream at 0.15% (w/w), whose concentration is close to KP flavonoid content in the extract.

Stability studies of KP leaf-extract cream showed no alterations in the organoleptic characteristics, phase separation, lump, and precipitate formation nor significant density variation over the evaluation period (60 days) (Table S1, supplementary material). The macroscopic analysis of both creams showed no changes in organoleptic characteristics after 180 days. Both formulations showed microbiological stability (Table S2, supplementary material), in accordance with the current regulation (Brasil 2010). KP leaf-extract cream, KP major flavonoid cream, base cream (negative control) and a commercial cream containing neomycin and bacitracin (positive control) were topically administered for 15 consecutive days to evaluate their healing effects in a rat excision wound model. Macroscopically, the groups treated with KP creams had cleaner wounds, without signs of inflammation since the beginning of treatment (Figure S1A, supplementary material).

On the 8th day, the differences between the two groups were remarkable (Figure S1B, supplementary material): KP leaf-extract group and KP major flavonoid group showed a wound healing of $61.7 \pm 2.8\%$ and $61.9 \pm 4.9\%$, respectively, while positive control group obtained $42.8 \pm 5.2\%$ of healing, and negative control group only $29.8 \pm 6.9\%$ (Figure S1B, supplementary material).

On the 12th day of treatment (Figure S1A, supplementary material), groups treated with KP leaf-extract and KP major flavonoid creams exhibited $95.3 \pm 1.2\%$ and $97.5 \pm 0.8\%$ of healing, respectively (Figure S1B, supplementary material). Under the same conditions, the positive control group healed in $96.7 \pm 0.8\%$, while the negative control group scarred in only $76.1 \pm 3.8\%$ ($p < 0.001$). By the 15th day, wounds of all groups had healed (Figure S1A, supplementary material), except for the negative control group ($p < 0.05$). Both KP creams were able to significantly increase the rate of wound contraction and reduce re-epithelialization time when compared to control groups.

At the end of the experiment, histological analysis using hematoxylin and eosin as well as Picrosirius were carried out. The skin wounds treated with both KP creams (Figure S2A and B, supplementary material) exhibited, in the sections stained with hematoxylin and eosin, and similarly to the positive control (Figure S2C, supplementary material), better results in comparison to the negative control: more pronounced re-epithelialization and repair of the dermis, with thicker bundles of eosinophilic collagen fibres interspersed with fibroblasts in the reticular region. In the negative control, re-epithelialization was absent or incomplete, and abundant fibroblasts were observed, suggesting a more immature tissue (Figure S2D, supplementary material). Moreover,

the treatment with both KP creams and the positive control allowed the regeneration of the skin appendages (hair follicles and sebaceous glands). Histological sections stained with red Picrosirius agreed with the previous findings: both KP formulations (Figure S3A and B, supplementary material) and positive control (Figure S3C, supplementary material) exhibited thicker and denser bundles of red-stained collagen fibres with respect to the negative control (Figure S3D, supplementary material).

The oral and topical administration of aqueous and organic leaf extracts of KP have already been evaluated in wound models (Khan et al. 2004; Nayak et al. 2010; Suprpto et al. 2015; Lebedeva et al. 2017). Ethanolic extracts of KP leaves reduced around 86% of wounds area in 11 days in a wound rat excisional model (Nayak et al. 2010). Moreover, an aqueous KP leaf extract showed 92% of healing at the 12th day in a similar model (Khan et al. 2004). This value is slightly lower than that we found in the present study, where differently from their protocol, the extract was incorporated into a cream. None of these studies has identified the healing promoter compound(s).

Wound healing agents can act in the inflammation, cellular proliferation and/or remodelling phases of wound healing (Kumar et al. 2007; Manzuoerh et al. 2019; Modarresi et al. 2019). Classic symptoms of inflammation are caused by the release of prostaglandins, leukotrienes and reactive oxygen and nitrogen species. In addition, wounds are also prone to infection by pathogenic microorganisms. Therefore, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of herbal agents can favour the whole healing process (Pazyar et al. 2014; Daemi et al. 2019; Seyed Ahmadi et al. 2019).

Recently, the antimicrobial, immunomodulatory and healing effects of an aqueous leaf extract of a wild type KP were demonstrated in a rat model of infected wounds (Lebedeva et al. 2017). According to the authors, the positive immunomodulating effect of the KP extract for the granulation and epithelialization of the wound seemed more important than the microbicide effect. KP extract did not show any toxicity at the daily dose of 1 mL (Lebedeva et al. 2017).

Besides the KP major flavonoid (peak 4), minor flavonol glycosides were identified by LC-MS in KP aqueous leaf-extract (Figure S4 and Table S3, supplementary material). Flavonol glycosides showed to have wound-healing effects (Krishnappa et al. 2016; Özbilgin et al. 2018).

At a concentration 40 times lower, KP major flavonoid cream proved to be as efficient as KP leaf-extract cream. This finding provides strong evidence that KP major flavonoid is the main responsible for the wound healing activity of KP extract. The strong antioxidant activity and *in vivo* anti-inflammatory activity (Nascimento et al. 2013; Ferreira et al. 2014) exhibited by this flavonoid might explain its healing performance.

3. Conclusions

We demonstrated for the first time the effectiveness of the major flavonoid of *K. pinnata* in *in vivo* wound healing. Considering the similar results of both formulations, the cream with KP leaf-extract could be more profitable and less expensive since the laborious, expensive and time-consuming steps for the isolation of its major flavonoid

would be avoided. Our results reinforce the potential of therapeutic application of this plant in basic health care.

4. Experimental

(Supplementary material)

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Brazil) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) – PIBIC/CNPq – Proc. 144036/2011-8; 151830/2012-6.

References

- Apsen. 2019. FITOSCAR® *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. [Internet]. [cited 2020 May 25]. https://www.apsen.com.br/wp-content/uploads/2020/04/07_FITOSCAR_VP_v03.pdf
- Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. 2013. Cutaneous wound healing: Recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 70(12):2059–2081.
- Brasil 2010. Farmacopeia Brasileira 5a Edição. 5th ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.
- Cawich SO, Harnarayan P, Budhooram S, Bobb NJ, Islam S, Naraynsingh V. 2014. Wonder of Life (*Kalanchoe pinnata*) leaves to treat diabetic foot infections in Trinidad & Tobago: A case control study. *Trop Doct.* 44(4):209–213.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G. 2012. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci.* 13(7):8615–8627.
- Coelho-Ferreira M. 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J Ethnopharmacol.* 126(1):159–175.
- Costa SS, Muzitano MF, Camargo LMM, Coutinho MAS. 2008. Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other secondary metabolites. *Nat Prod Commun.* 3:1–14.
- Coutinho MAS, Muzitano MF, Cruz EA, Bergonzi MC, Kaiser CR, Tinoco LW, Bilia AR, Vincieric FF, Rossi-Bergmann B, Costa SS. 2012. Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a rich source of T cell-suppressive flavonoids. *Nat Prod Commun.* 7:175–178.
- Daemi A, Farahpour MR, Oryan A, Karimzadeh S, Tajer E. 2019. Topical administration of hydroethanolic extract of *Lawsonia inermis* (henna) accelerates excisional wound healing process by reducing tissue inflammation and amplifying glucose uptake. *Kaohsiung J Med Sci.* 35(1): 24–32.
- dos Santos Nascimento LB, de Aguiar PF, Leal-Costa MV, Coutinho MAS, Borsodi MPG, Rossi-Bergmann B, Tavares ES, Costa SS. 2018. Optimization of aqueous extraction from *Kalanchoe pinnata* leaves to obtain the highest content of an anti-inflammatory flavonoid using a response surface model. *Phytochem Anal.* 29(3):308–315.
- Fan K, Tang J, Escandon J, Kirsner RS. 2011. State of the art in topical wound-healing products. *Plast Reconstr Surg.* 127:445–595.
- Ferreira RT, Coutinho MAS, Malvar DDC, Costa EA, Florentino IF, Costa SS, Vanderlinde FA. 2014. Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity

- of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 1–8.
- IPNI 2020. International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens. [cited 2020 Jun 7]. <http://www.ipni.org>.
- Khan M, Patil PA, Shobha JC. 2004. Influence of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) leaf extract on wound healing in albino rats. J Nat Remedies. 4:41–46.
- Krishnappa P, Venkatarangaiah K, Venkatesh Shimoga Rajanna SK, Kayattukandy Balan R. 2016. Wound healing activity of *Delonix elata* stem bark extract and its isolated constituent quercetin-3-rhamnopyranosyl-(1-6) glucopyranoside in rats. J Pharm Anal. 6:389–395.
- Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. J Ethnopharmacol. 114(2): 103–113.
- Lebedeva AA, Zakharchenko NS, Trubnikova EV, Medvedeva OA, Kuznetsova TV, Masgutova GA, Zylkova MV, Buryanov YI, Belous AS. 2017. Bactericide, immunomodulating, and wound healing properties of transgenic *Kalanchoe pinnata* synergize with antimicrobial peptide cecropin P1 in Vivo. J Immunol Res. 2017:1–9.
- Manzuoerh R, Farahpour MR, Oryan A, Sonboli A. 2019. Effectiveness of topical administration of *Anethum graveolens* essential oil on MRSA-infected wounds. Biomed Pharmacother. 109: 1650–1658.
- Ministério da Saúde. 2009. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS [Internet]. [cited 2020 May 25];2. <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>.
- Modarresi M, Farahpour M-R, Baradaran B. 2019. Topical application of *Mentha piperita* essential oil accelerates wound healing in infected mice model. Inflammopharmacology. 27(3):531–537.
- Nascimento LBS, Leal-Costa MV, Coutinho MAS, Moreira NDS, Lage CLS, Barbi NDS, Costa SS, Tavares ES. 2013. Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. Photochem Photobiol. 89(2):391–399.
- Nayak BS, Marshall JR, Isitor G. 2010. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf—a preliminary study. Indian J Exp Biol. 48(6):572–576.
- Özbilgin S, Acikara ÖB, Akkol EK, Süntar I, Keleş H, Işcan GS. 2018. In vivo wound-healing activity of *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii*: Isolation and quantification of quercetin glycosides as bioactive compounds. J Ethnopharmacol. 224:400–408.
- Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A. 2014. Skin wound healing and phytomedicine: A review. Skin Pharmacol Physiol. 27(6):303–310.
- Pereira RF, Bártolo PJ. 2016. Traditional therapies for skin wound healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 5(5):208–229.
- Seyed Ahmadi SG, Farahpour MR, Hamishehkar H. 2019. Topical application of *Cinnamon verum* essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. Kaohsiung J Med Sci. 35(11):686–694.
- Smith GF, Figueiredo E. 2018. Nomenclatural notes on *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae). Bradleya. 36(36):220–223.
- Stevens PF. 2017. Angiosperm Phylogeny Website. Version 4. [cited 2020 Jun 7]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Suprpto AK, Tih F, Evacuasianny E. 2015. Effect of methanolic extract in ointment and powder of *Kalanchoe pinnata* (Lamk) leaf in ointment towards incision wound healing in mice. J Med Heal. 1:12–19.
- The Plant List 2013. Version 11. [cited 2020 Jun 7]. <http://www.theplantlist.org>.
- Tropicos.org 2020. Missouri Botanical. [cited 2020 Jun 7]. <http://www.tropicos.org>.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. 2009. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res. 37(5):1528–1542.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Wound healing cream formulated with *Kalanchoe pinnata* major flavonoid is as effective as the aqueous leaf extract cream in a rat model of excisional wound

Marcela Araújo Soares Coutinho^{a#}, Livia Marques Casanova^a, Luana Beatriz dos Santos Nascimento^b, Diogo Leal^a, Celia Palmero^c, Helena Keiko Toma^d, Elisabete Pereira dos Santos^d, Luiz Eurico Nasciutti^c and Sônia Soares Costa^{a*}

^a*Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

^b*Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

^c*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

^d*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

Current address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro (Maracanã), 20270-021 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Correspondence: Sônia Soares Costa sscosta@ippn.ufrj.br; sscostabh@gmail.com

Abstract

Leaves of *Kalanchoe pinnata* are used worldwide for healing skin wounds. This study aimed to develop and compare two creams containing a leaf aqueous extract of *K. pinnata* (KP; 6 %) and its major flavonoid [quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside] (0.15 %). Both creams were topically evaluated in a rat excision model for 15 days. On the 12th day, groups treated with KP leaf-extract and KP major flavonoid creams exhibited 95.3 ± 1.2 % and 97.5 ± 0.8 % of healing, respectively (positive control = 96.7 ± 0.8 %; negative control = 76.1 ± 3.8 %). Both resulted in better re-epithelialization and denser collagen fibres. Flavonol glycosides are the main phenolics in KP leaf-extract according to HPLC-ESI-MS/MS analysis. KP major flavonoid plays a fundamental role in the wound healing. The similar results found for both creams indicate that the use of KP crude extract should be more profitable than the isolated compound.

Keywords

Bryophyllum pinnatum; Crassulaceae; skin wound healing; pharmaceutical formulations; phytotherapy; quercetin diglycoside; anti-inflammatory.

List of Contents

Experimental section

Table S1: Evaluation of appearance, pH and density of *Kalanchoe pinnata* leaf-extract 6% (w/w) over 60 days of study under three different storage conditions.

Table S2. Microbiological data of *Kalanchoe pinnata* (KP) pharmaceutical formulations.

Table S3. Chromatographic and spectroscopic properties of substances detected in *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf-extract by HPLC-ESI-MS/MS in the negative ion mode.

Figure S1. Macroscopic evolution of wound healing in the different groups tested, along the period of treatment (15 consecutive days). Images are representative of each sample group (A). Effect of KP formulations, positive and negative controls on wound healing throughout 15 days of treatment. Values given as mean $\pm$ standard error (n = 5). Statistic: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, relative to the negative control (B).

Figure S2. Representative photomicrographs of histological sections of scar in rat skin wound treated with KP leaf-extract cream 6% (**A**), KP major flavonoid cream 0.15% (**B**), a commercial cream containing neomycin and bacitracin - positive control (**C**) and with the vehicle - negative control (**D**). Observe in (**B**) the presence of a reepithelialization zone. E: epidermis; D: dermis; RE: reepithelialization; FB: fibroblasts; CL: collagen; SG: sebaceous gland. Staining: Hematoxylin-Eosin. Scale bar: 50 μ m (200X magnification).

Figure S3. Representative photomicrographs of histological sections of scar in rat skin wound treated with KP leaf-extract cream 6% (**A**), KP major flavonoid cream 0.15% (**B**), a commercial cream containing neomycin and bacitracin - positive control (**C**) and with the vehicle - negative control (**D**). Note that collagen fibers are more abundant, and more colored in the wounds treated with KP leaf-extract cream 6% and KP major flavonoid cream 0.15%, and in the positive control (**A**, **B**, and **C**, respectively). Also note that the epidermis in the negative control (**D**) is thinner, and the stratum corneum cannot be seen with the same magnification. E: epidermis; D: dermis; CL: collagen; SG: sebaceous gland. Staining: Picrosirius. Scale bar: 50 μ m. (100X magnification).

Figure S4. HPLC-ESI-MS/MS base peak chromatogram of *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf-extract (2 mg/mL) in the negative ion mode. Peaks: 1. malic acid; 2. quinic acid; 3. myricetin-*O*-deoxy-hexoside-*O*-pentoside¹; 4. quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside (major flavonoid)*; 5. quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (quercitrin)*; 6. kaempferol-*O*-deoxy-hexoside-*O*-pentoside²; ¹ Possibly myricetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside; ² Possibly kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside (kapinnatoside) (Fürer et al., 2016; Wishart et al., 2018). *Confirmed by comparison with authentic standard.

Experimental section

Plant material, extraction and flavonoid isolation

Leaves of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. specimens (out of blooming season; voucher specimen RB 292.697) were collected in Araruama (22° 520' 22" S, 42° 200' 35" W) – Rio de Janeiro (RJ, Brazil). Fresh leaves (2.08 kg) were triturated, and extracted with distilled water at 20% (w/v) for 30 min at 50 °C - 60 °C, affording 93.14 g of dried extract after lyophilization. The major flavonoid of *K. pinnata*, quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside (95% purity), was isolated as reported before (Coutinho et al., 2012).

HPLC-ESI-MS/MS analysis

HPLC-ESI-MS/MS analyses were carried out on a Thermo Scientific LCQ FLEET UPLC system (Thermo Fisher Scientific) (Faculty of Pharmacy, UFRJ).

Samples were dissolved in water/acetonitrile (9:1) to final concentrations of 2 mg/mL (extract) or 0.2 mg/mL (major flavonoid and quercitrin) and filtered through 0.20 µM polypropylene syringe filters (25 mm; Econofilter, Agilent®). The HPLC conditions are described in Nascimento et al. (2018). MS measurements were carried out with helium as the collision gas in the ion trap and nitrogen as the sheath and auxiliary gas in the source. For ESI in the negative ion mode, the following parameters were used: capillary temperature: 400 °C, sheath gas flow: 35 L/min, auxiliary gas flow: 10 L/min, spray voltage: 5.5 kV. An isolation width of 2 Da was used with a 30 ms activation time for the MS/MS experiments. The mass range analysed was from m/z 50 to 1000.

HPLC-DAD analyses

HPLC-DAD analyses were performed on a Shimadzu liquid chromatograph LC-20AT (IPPEN – UFRJ, RJ, Brazil) with a diode-array wavelength SPD-M20A detector using a Merck reverse-phase column C-18 (5 µm, 250 mm, 4 mm) (Nascimento et al., 2018). An analytical calibration curve was elaborated using quercitrin (Sigma-Aldrich) as standard. KP major flavonoid was quantified using an analytical curve ($y = 26346x + 13522$; $R^2 = 0.9969$) with a correction factor (molecular mass of KP major flavonoid /molecular mass of quercitrin).

Development of KP leaf-extract and KP major flavonoid formulations

A non-ionic cream base was prepared using glyceryl monostearate (Embacaps®) – 4 g, cetostearyl alcohol (Embacaps®) – 8 g, ethoxylated cetostearyl alcohol (ChemSpecs®) – 2 g, liquid vaseline (Mapric®) – 2 g, isooctyl stearate (Embacaps®) – 3 g, phenoxyethanol associated with parabens (Pharma Special®) – 0.3 g, glycerin (Fagron®) – 7 g, and purified water in sufficient quantity to 100 g. The components of the oil phase were heated at a controlled temperature of 75°-80 °C. The aqueous phase was also separately heated, at the same temperature, and slowly added to the oil phase, under constant stirring (900 rpm). A 6% KP leaf extract (60 mg/g) and a 0.15 % KP major flavonoid (1.5 mg/g) creams were prepared.

Analysis of KP formulations

Stability tests

The stability evaluation was conducted under three conditions: room temperature (25 °C ± 3 °C), refrigerator (5 °C ± 2 °C) and stove (40 °C ± 2 °C). Samples were

analysed immediately after their preparation (time zero), and at 30th and 60th day, by visual inspection and density parameters.

Microbiological analyses

The microbiological safety of the creams was evaluated at the Laboratory of Microbiological Medicines, Food and Cosmetics (Faculty of Pharmacy, UFRJ) according to the following parameters in compliance with the requirements of the Brazilian Pharmacopoeia for non-sterile products (Brasil, 2010): presence of *Escherichia coli* and fecal bacteria; fungi and yeasts; *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*; and total count of aerobic microorganisms. For these analyses, 5 g of each sample were inoculated in appropriate medium.

Wound healing assay

Twenty male Wistar rats (200-250 g) were individually housed in a light/dark cycle of 12:12 hours, with controlled ambient temperature, water and feed *ad libitum*.

Animals were randomly assigned into following four groups of five rats each: a) negative control (cream base), b) positive control, a marketed medicine for the treatment of wounds containing neomycin base (3.5 mg) and bacitracin (250 UI) per gram/cream, c) KP leaf-extract cream and d) KP major flavonoid cream.

After anesthesia with ketamine (5 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg), trichotomy of the dorsal region and asepsis were carried out followed by an excision (1.0 cm²). Samples were applied topically, once a day, for 15 consecutive days. The wound closure was evaluated on alternate days (01, 04, 08, 12, and 15) by Sketchup[®] 8 program, using millimeter photos. The polyline method was used to determine the respective areas, and the percentage wound closure was calculated: % wound closure = initial wound area – final wound area x 100/ initial wound area.

The study was approved by the ethics committee for animal experimentation (NPPN03) of Federal University of Rio de Janeiro (CEUA-UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

Histological analysis

At the end of the treatment, animals were euthanized using compressed CO₂ gas and tissue samples were removed around the wound. The samples were fixed (10% formaldehyde buffer solution), dehydrated in increasing concentrations of ethanol,

clarified in xylene, and then, included in paraffin. The paraffin blocks were cut using a Minot-type manual rotary microtome (5-7 μm). The histological sections mounted on a slide were stained with Hematoxylin-eosin, for a general tissue analysis, and with Picrosirius Red to observe the deposition of collagen fibers. Histological images were obtained in an optical microscopic Axioplan (Zeiss, Germany) coupled with a digital Evolution MP Color camera (MediaCybernetics, CE, Canada) and analysed by the Q-Capture[®] program.

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard error ($n = 5$). The statistical differences between groups were detected by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-test. Differences were considered statically significant when $p \leq 0.05$.

Table S1: Evaluation of appearance, pH and density of *Kalanchoe pinnata* leaf-extract 6% (w/w) over 60 days of study under three different storage conditions.

<i>Kalanchoe pinnata</i> leaf-extract cream				
Storage Condition	Time (days)	Appearance	pH	Density (g/mL)
Room Temperature (25°C $\pm$ 3°C)	0	N/C	4.25	1.0297
	30	N/C	4.07	1.0259
	60	N/C	4.30	1.0260
Refrigerator (5°C $\pm$ 2°C)	0	N/C	4.25	1.0297
	30	N/C	4.15	1.0269
	60	N/C	4.34	1.0310
Stove (5°C $\pm$ 2°C)	0	N/C	4.25	1.0297
	30	N/C	4.06	1.0240
	60	N/C	4.22	1.0160
N/C = no change				

Table S2. Microbiological data of *Kalanchoe pinnata* (KP) pharmaceutical formulations.

Parameter	KP leaf-extract cream	KP major flavonoid cream	Reference value
<i>Escherichia coli</i>	Absent	Absent	Absent
Fungi and yeasts	< 10 CFU/g	< 10 CFU/g	10 ¹ CFU/g
Total bacteria	<10 CFU/g	< 10 CFU/g	10 ² CFU/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absent	Absent	Absent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absent	Absent	Absent

CFU = colony formation unit

Table S3. Chromatographic and spectroscopic properties of substances detected in *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf-extract by HPLC-ESI-MS/MS in the negative ion mode.

Peak Nr	Rt (min)	[M-H] ⁻	Fragment ions	Proposed structure
1	3.8	133	115	Malic acid
2	4.2	191	173, 129, 111	Quinic acid
3	18.8	595	316, 287, 271	Myricetin- <i>O</i> -deoxy-hexoside- <i>O</i> -pentoside ¹
4	23.3	579	447, 301, 300 271, 255	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnoside (major flavonoid)*
5	24.2	447	301, 300, 271, 255	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside (quercitrin)*
6	29.2	563	431, 285, 284, 255	Kaempferol- <i>O</i> -deoxy-hexoside- <i>O</i> -pentoside ²

¹Possibly myricetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside; ²Possibly kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside (kapinnatoside) (Fürier et al., 2016; Wishart et al., 2018).

*Confirmed by comparison with authentic standard.

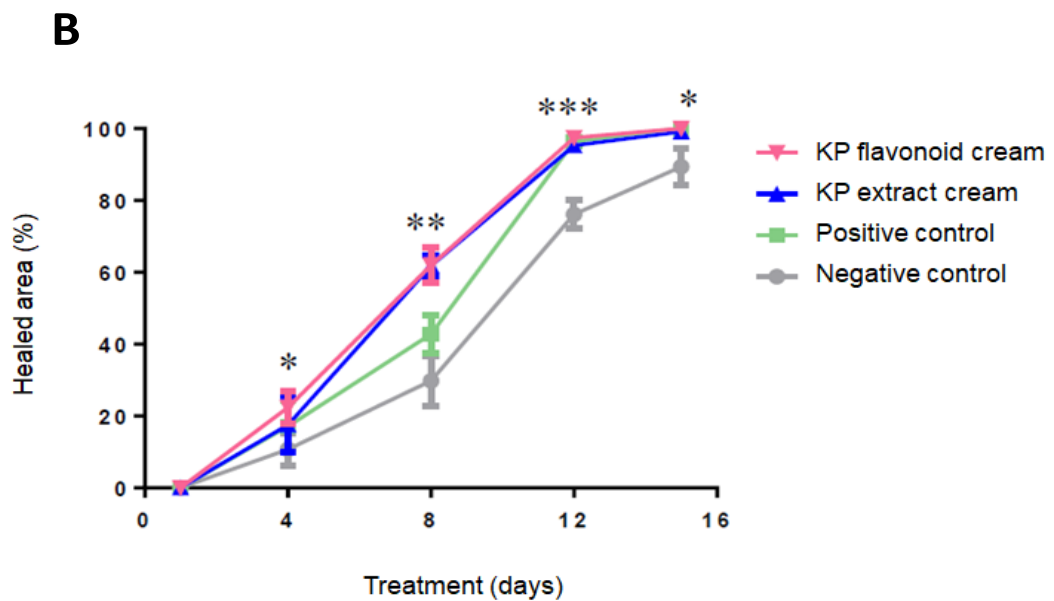
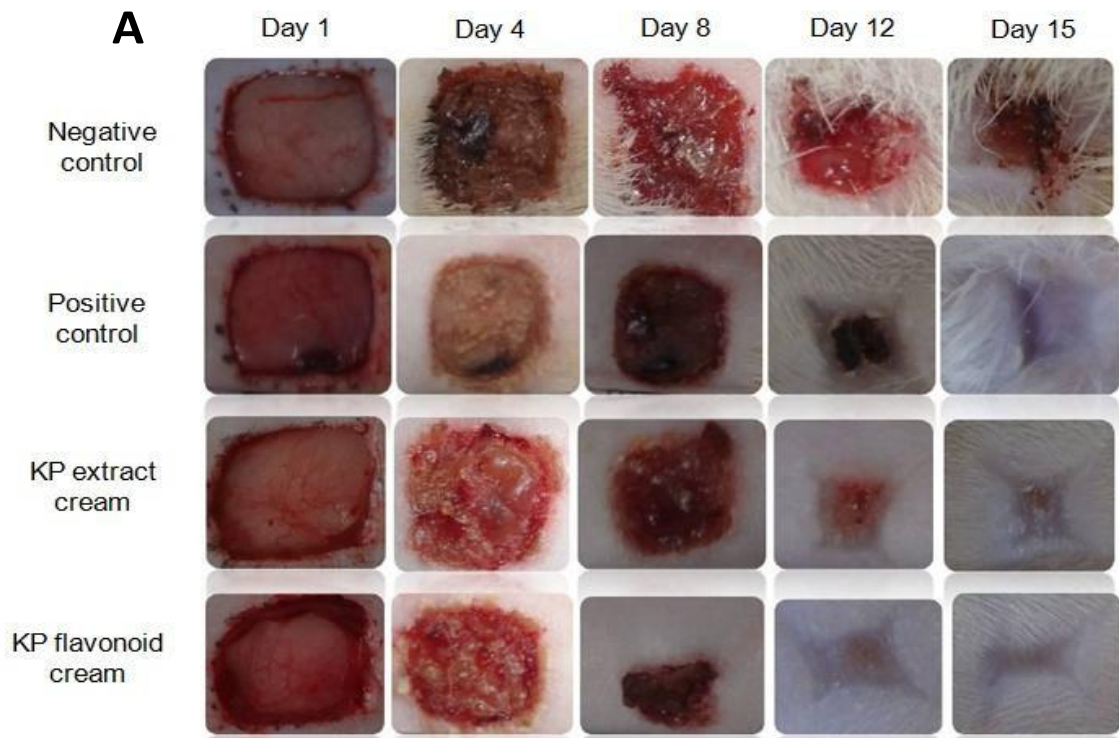


Figure S1. Macroscopic evolution of wound healing in the different groups tested, along the period of treatment (15 consecutive days). Images are representative of each sample group (A). Effect of KP formulations, positive and negative controls on wound healing throughout 15 days of treatment. Values given as mean $\pm$ standard error ($n = 5$). Statistic: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, relative to the negative control (B).

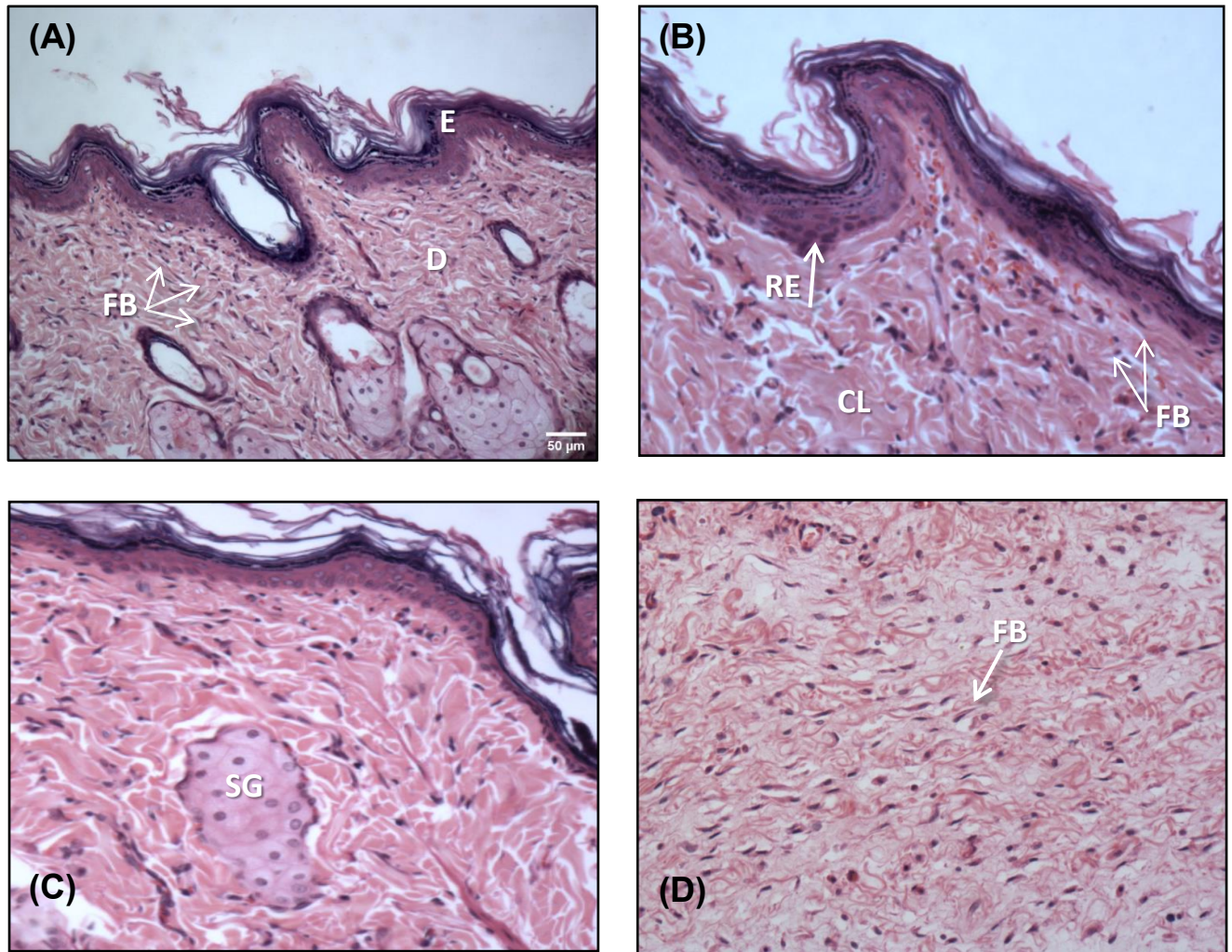


Figure S2. Representative photomicrographs of histological sections of scar in rat skin wound treated with KP leaf-extract cream 6% (A), KP major flavonoid cream 0.15% (B), a commercial cream containing neomycin and bacitracin - positive control (C) and with the vehicle - negative control (D). Observe in (B) the presence of a reepithelialization zone. E: epidermis; D: dermis; RE: reepithelialization; FB: fibroblasts; CL: collagen; SG: sebaceous gland. Staining: Hematoxylin-Eosin. Scale bar: 50 μm (200X magnification).

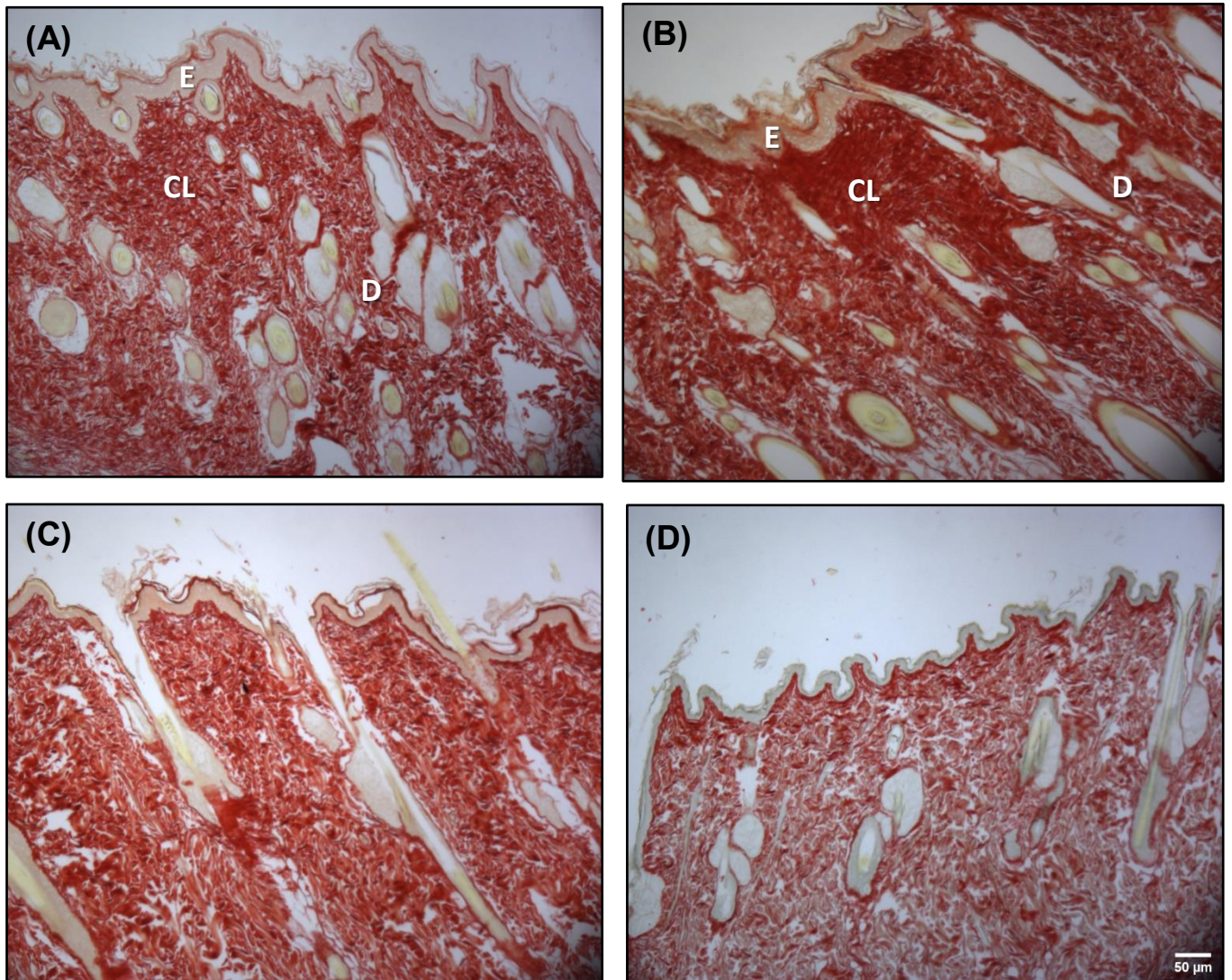


Figure S3. Representative photomicrographs of histological sections of scar in rat skin wound treated with KP leaf-extract cream 6% (A), KP major flavonoid cream 0.15% (B), a commercial cream containing neomycin and bacitracin - positive control (C) and with the vehicle - negative control (D). Note that collagen fibers are more abundant, and more colored in the wounds treated with KP leaf-extract cream 6% and KP major flavonoid cream 0.15%, and in the positive control (A, B, and C, respectively). Also note that the epidermis in the negative control (D) is thinner, and the stratum corneum cannot be seen with the same magnification. E: epidermis; D: dermis; CL: collagen; SG: sebaceous gland. Staining: Picrosirius. Scale bar: 50 µm. (100X magnification).

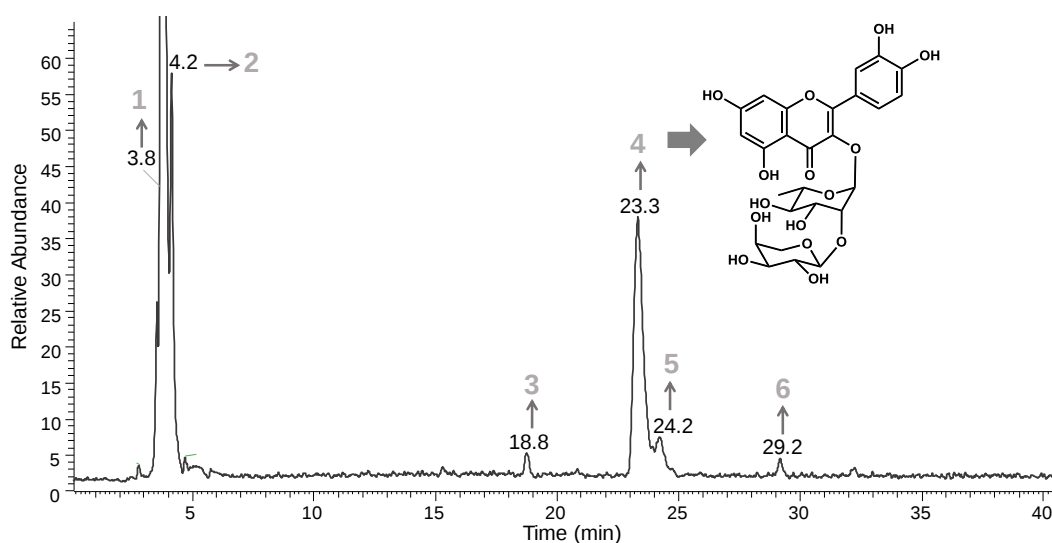


Figure S4. HPLC-ESI-MS/MS base peak chromatogram of *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf-extract (2 mg/mL) in the negative ion mode. Peaks: 1. malic acid; 2. quinic acid; 3. myricetin-*O*-deoxy-hexoside-*O*-pentoside¹; 4. quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside (major flavonoid)*; 5. quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (quercitrin)*; 6. kaempferol-*O*-deoxy-hexoside-*O*-pentoside²; ¹ Possibly myricetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside; ² Possibly kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside (kapinnatoside) (Fürer et al., 2016; Wishart et al., 2018). *Confirmed by comparison with authentic standard.

References

- Fürer, K., Simões-Wüst, A., von Mandach, U., Hamburger, M., Potterat, O., 2016. *Bryophyllum pinnatum* and related species used in anthroposophic medicine: constituents, pharmacological activities, and clinical efficacy. *Planta Med.* 82, 930–941. doi:10.1055/s-0042-106727
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., Scalbert, A., 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, D608–D617. doi:10.1093/nar/gkx1089