

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA MAZEPA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS, TOXICIDADE E POLISSACARÍDEOS DA ESPÉCIE VEGETAL *Anredera  
tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling

CURITIBA

2024

LETÍCIA MAZEPA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS, TOXICIDADE E POLISSACARÍDEOS DA ESPÉCIE VEGETAL *Anredera*  
*tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, no Setor de Ciências da Saúde, na  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à  
obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Coorientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Coorientadora: Profa. Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro

CURITIBA

2024

Mazepa, Letícia

Caracterização físico-química, estudo fitoquímico, atividades biológicas, toxicidade e polissacarídeos da espécie vegetal *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling [recurso eletrônico] / Letícia Mazepa – Curitiba, 2024.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadores: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Profa Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro

1. Basellaceae. 2. Antioxidantes. 3. Compostos fitoquímicos. 4. Toxicidade. 5. Polissacarídeos. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Cordeiro, Lucimara Mach Cortes. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 583.883



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LETÍCIA MAZEPA**, intitulada: **Caracterização Físico-química, Estudo Fitoquímico, Atividades Biológicas, Toxicidade e Polissacarídeos da Espécie Vegetal *Anredera tucumanensis* (Lillo&Hauman) Sperling**, sob orientação do Prof. Dr. **OBDULIO GOMES MIGUEL**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica  
10/07/2024 15:25:59.0  
OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
04/07/2024 20:37:38.0  
VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL -  
UNINTER)

Assinatura Eletrônica  
21/06/2024 15:57:32.0  
JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
20/06/2024 10:53:39.0  
CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 373829

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 373829

*Dedico este trabalho à minha família  
pelo amor, apoio, compreensão  
e incentivo em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e à Nossa Senhora pela fé e força nos momentos difíceis, em especial naqueles em que pensei em desistir.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pelo acolhimento desde a graduação em Nutrição, ao longo do Mestrado em Segurança Alimentar e Nutricional e, nos últimos anos, na caminhada do Doutorado em Ciências Farmacêuticas.

Em especial ao meu orientador, professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, por ir além do seu conhecimento técnico no processo de orientação. À esse profissional e pessoa que admiro muito, obrigada pela empatia, apoio, paciência e confiança.

Também de modo especial, agradeço a coorientação das professoras Dra. Marilis Dallarmi Miguel e Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro, que foram essenciais na realização dessa pesquisa. Obrigada por tanto aprendizado, pela sensibilidade e por tornarem leves os momentos mais duros.

Aos meus pais, que sempre me impulsionaram aos caminhos do saber e a todo momento acreditaram que cada sonho seria possível.

Ao meu marido Tiago, pelo amor, pela parceria e por ser o meu maior incentivador em cada novo projeto profissional e de vida.

Aos meus amigos, pelo suporte, estímulo e compreensão.

À minha colega e amiga Paula Piekarski, por toda a assistência, companheirismo e tantas trocas fundamentais nesse período.

Aos meus colegas do Núcleo de Estudos em Produtos Naturais e Farmacotécnica, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Em especial aos doutorandos Cíntia Anjos, Elisiane de Bona Sartor e Idonilton Fernandes pelo apoio, disponibilidade e contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

À professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio no registro do SisGen e por todos os ensinamentos no desenvolvimento do artigo.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por abrir as portas para essa pesquisa através da coorientação da professora Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro.

À então doutoranda e agora Dra. Vanessa Schneider, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela recepção e assessoria na extração e identificação dos polissacarídeos.

Aos técnicos Paulo e Gracinha do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, por toda a ajuda.

Ao técnico Jair do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, sempre muito solícito a contribuir em todas as etapas práticas das quais tivesse conhecimento.

À pós-doutoranda e professora Suelen Ávila pelo apoio nos ensaios de doseamento de compostos e atividade antioxidante, nas orientações do tratamento estatístico e na melhor condução do desenho de pesquisa.

À doutoranda Juliana Campos Altherino e ao professor Wesley Mauricio de Souza, do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio na realização da atividade antimicrobiana.

Ao Marcelo Leandro Brotto, Engenheiro Florestal do Museu Botânico de Curitiba, pela identificação do material e registro da exsicata.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois  
desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.*

**Guimarães Rosa**

## RESUMO

Dentre as espécies vegetais disponíveis no Brasil as chamadas plantas alimentícias não convencionais têm despertado cada vez mais interesse da comunidade científica. Isso porque muitas delas parecem extrapolar os benefícios nutricionais, demonstrando potenciais atividades biológicas. Pertencente à família Basellaceae, a *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling (*A. tucumanensis*) pode ser encontrada em algumas regiões do território nacional. O objetivo desse estudo foi analisar a composição físico-química, o perfil fitoquímico, as atividades biológicas, a toxicidade e os polissacarídeos da espécie vegetal *A. tucumanensis*. O material botânico foi coletado na região serrana do Paraná e submetido à identificação. Foram realizados ensaios de umidade, cinzas, acidez titulável, pH, teor de proteína, teor de lipídios e fibras totais. Parte do material foi extraído com acetona em Soxhlet, seguido do fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila). Também foi realizada a extração de folhas e caules com etanol. Extratos e frações de folha e caule foram analisados quanto ao teor de flavonoides, teor de fenólicos e propriedade antioxidante. *Screening* fitoquímico, toxicidade preliminar, atividade antimicrobiana e caracterização de metabólitos secundários foram conduzidos apenas com extratos e frações das folhas. O resíduo das folhas, após extração com etanol, foi submetido a extrações aquosa e alcalina para análises de composição monossacarídica, teor de urônicos, homogeneidade e identificação de polissacarídeos. Na composição físico-química a folha apresentou o maior teor de umidade (82,81%) e mais de 8% de proteína, o caule se destacou pelo maior teor de fibras totais, sendo de 7,46g em 100g de material seco. O extrato cetônico do caule apresentou melhor rendimento quando comparado ao da folha. As frações clorofórmio de folha e caule se destacaram no teor de compostos fenólicos e propriedade antioxidante. Fração remanescente de folha e extrato etanólico do caule obtiveram maior teor de flavonoides. Pelo *screening* fitoquímico foi identificada a presença de flavonoides na folha, isso para extrato cetônico, extrato etanólico, fração clorofórmio e fração acetato de etila. Os espectros de RMN dos isolados do extrato etanólico da folha corroboraram com a possível presença de flavonoide, além de hidrocarboneto de cadeia longa e ramnose. No teste da *Artemia salina* nenhum extrato e frações da folha apresentou toxicidade, o mesmo foi observado quanto à atividade hemolítica e atividade antimicrobiana. Na caracterização de carboidratos, extrato aquoso e frações apresentaram predominância no teor de arabinose e galactose, e a presença de ramnose corroborou com a suspeita da análise prévia com o extrato etanólico supracitado. Extratos e frações alcalinas foram predominantes em arabinose, glucose e galactose na composição monossacarídica. Em ambas as extrações e respectivas frações, aquosa e alcalina, foi detectada a presença de arabinogalactanas tipo I e II. O destaque no isolamento de polissacarídeos foi atribuído à presença da  $\beta$ -L-arabinana, um homopolissacarídeo pouco citado na literatura. Esse estudo iniciou a investigação da composição da *A. tucumanensis* e pôde verificar seu potencial nutricional e biológico, especialmente pelas propriedades antioxidantes e conteúdo de polissacarídeos de interesse à saúde humana, seja por meio do consumo alimentar ou da aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: Basellaceae; *Anredera*; *Anredera tucumanensis*; antioxidante; fitoquímico; toxicidade; polissacarídeos.

## ABSTRACT

Among the plant species available in Brazil, the so-called unconventional food plants have attracted increasing interest from the scientific community. This is because many of them seem to extrapolate nutritional benefits, demonstrating potential biological activities. Belonging to the Basellaceae family, *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling (*A. tucumanensis*) can be found in some regions of the national territory. The objective of this study was to analyze the physicochemical composition, phytochemical profile, biological activities, toxicity and polysaccharides of the plant species *A. tucumanensis*. The botanical material was collected in the mountainous region of Paraná and submitted for identification. Moisture, ash, titratable acidity, pH, protein content, lipid content and total fiber tests were carried out. Part of the material was extracted with acetone in Soxhlet, followed by partitioning with solvents of increasing polarity (hexane, chloroform, ethyl acetate). Extraction of leaves and stems with ethanol was also carried out. Leaf and stem extracts and fractions were analyzed for flavonoid content, phenolic content and antioxidant property. Phytochemical screening, preliminary toxicity, antimicrobial activity and characterization of secondary metabolites were conducted only with leaf extracts and fractions. The residue from the leaves, after extraction with ethanol, was subjected to aqueous and alkaline extractions for analysis of monosaccharide composition, uronic content, homogeneity and identification of polysaccharides. In terms of physicochemical composition, the leaf had the highest moisture content (82.81%) and more than 8% protein, the stem stood out for the highest total fiber content, being 7.46g in 100g of dry material. The crude stem extract showed better yield when compared to the leaf extract. The leaf and stem chloroform fractions stood out in terms of their phenolic compound content and antioxidant properties. Remaining fraction of leaf and ethanolic extract of the stem had higher flavonoid content. By phytochemical screening, the presence of flavonoids in the leaf was identified, for crude extract, ethanolic extract, chloroform fraction and ethyl acetate fraction. The NMR spectra of isolates from the ethanol extract of the leaf corroborated the possible presence of flavonoids, in addition to long-chain hydrocarbons and rhamnose. In the *Artemia salina* test, no extract and fractions of the leaf showed toxicity, the same was observed regarding hemolytic activity and antimicrobial activity. In the characterization of carbohydrates, aqueous extract and fractions showed a predominance of arabinose and galactose content, and the presence of rhamnose corroborated the suspicion of the previous analysis with the aforementioned ethanolic extract. Extracts and alkaline fractions were predominant in arabinose, glucose and galactose in the monosaccharide composition. In both extractions and respective fractions, aqueous and alkaline, the presence of type I and II arabinogalactans was detected. The highlight in the isolation of polysaccharides was attributed to the presence of  $\beta$ -L-arabinan, a homopolysaccharide rarely mentioned in the literature. This study initiated the investigation of the composition of *A. tucumanensis* and was able to verify its nutritional and biological potential, especially due to its antioxidant properties and polysaccharide content of interest to human health, whether through food consumption or application in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Basellaceae; *Anredera*; *Anredera tucumanensis*; antioxidant; phytochemical toxicity; polysaccharides.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Anredera</i> .....	29
FIGURA 2 -	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DA PESQUISA REALIZADA COM A ESPÉCIE VEGETAL <i>Anredera tucumanensis</i> (Lillo & Hauman) <i>Sperling</i> .....	37
FIGURA 3 -	LOCAL DA COLETA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> NA SERRA DA GRACIOSA, MUNICÍPIO DE MORRETES, PARANÁ.....	38
FIGURA 4 -	ETAPAS DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE FOLHAS E CAULES DA <i>A. tucumanensis</i> .....	39
FIGURA 5 -	ANÁLISE DE UMIDADE E CINZAS DA <i>A. tucumanensis</i> .....	40
FIGURA 6 -	ANÁLISE DO TEOR DE PROTEÍNA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	41
FIGURA 7 -	ANÁLISE DO TEOR DE LIPÍDIO DA <i>A. tucumanensis</i> .....	42
FIGURA 8 -	PREPARO DO EXTRATO CETÔNICO DA <i>A. tucumanensis</i> .....	43
FIGURA 9 -	FRACIONAMENTO DO EXTRATO CETÔNICO DA <i>A. tucumanensis</i> .....	44
FIGURA 10 -	DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS E DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA <i>A. tucumanensis</i> .....	46
FIGURA 11 -	ANÁLISE DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> e FRAP DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA <i>A. tucumanensis</i> .....	47
FIGURA 12 -	CROMATOPLACAS DE SÍLICA GEL PARA ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	48
FIGURA 13 -	COLUNA DE SÍLICA GEL DA FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS DA <i>A. tucumanensis</i> .....	50
FIGURA 14 -	ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM COLUNA SEPHADEX.....	51
FIGURA 15 -	ETAPAS DO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	52
FIGURA 16 -	PREPARO DO SANGUE DE CARNEIRO PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	53

FIGURA 17 -	ETAPAS DO ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	55
FIGURA 18 -	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NA MICROPLACA PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	55
FIGURA 19 -	ENSAIO ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	56
FIGURA 20 -	DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA <i>A. tucumanensis</i> PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
FIGURA 21 -	ETAPAS DO PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	58
FIGURA 22 -	FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES PARA ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	59
FIGURA 23 -	PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	60
FIGURA 24 -	ETAPAS DA ANÁLISE DE ÁCIDOS URÔNICOS DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	62
FIGURA 25 -	FOLHA FRESCA DA <i>A. tucumanensis</i> APÓS TRITURAÇÃO.....	66
FIGURA 26 -	COMPARAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, TEOR DE FLAVONOÍDEOS TOTAIS E DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA E CAULE DA <i>A. tucumanensis</i> .....	70
FIGURA 27 -	PLACAS DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS QUÍMICOS EM EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	72
FIGURA 28 -	ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	74
FIGURA 29 -	ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	75

FIGURA 30 -	SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE VIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	76
FIGURA 31 -	ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE28A30) DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	77
FIGURA 32 -	ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE28A30) DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	77
FIGURA 33 -	ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE64E67) DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	78
FIGURA 34 -	ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE64E67) DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> .....	79
FIGURA 35 -	ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> COMPARADOS À SAPONINA.....	83
FIGURA 36 -	MICROPLACAS DO ENSAIO ANTIBACTERIANO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A.</i> <i>tucumanensis</i> APÓS INCUBAÇÃO.....	84
FIGURA 37 -	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A.</i> <i>tucumanensis</i> .....	87
FIGURA 38 -	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	87
FIGURA 39 -	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW100E COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	89
FIGURA 40 -	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW100R COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	89
FIGURA 41-	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SOBRENADANTES DO EXTRATO ALCALINO OBTIDO DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A.</i> <i>tucumanensis</i> .....	91

FIGURA 42 -	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFASA COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) EXPRESSOS EM PPM.....	92
-------------	--	----

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - METODOLOGIAS USADAS PARA INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	49
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	64
TABELA 2 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO EXTRATO CETÔNICO DA FOLHA E DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A.tucumanensis</i> .....	66
TABELA 3 - DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS, DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	67
TABELA 4 - DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS, DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	69
TABELA 5 - RESULTADOS DA PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	71
TABELA 6 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA <i>A. tucumanensis</i> . FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i> .....	81
TABELA 7 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	82
TABELA 8 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> .....	86
TABELA 9 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO ALCALINO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>A. tucumanensis</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<sup>13</sup> C	Carbono 13
<sup>1</sup> H	Hidrogênio 1
Abs	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AG	Arabinogalactana
AG-I	Arabinogalactana tipo 1
AG-II	Arabinogalactana tipo 2
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGPs	Arabinogalactana-proteínas
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato-adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ara	Arabinose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATFA	Extrato alcalino da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFAS	Fração sobrenadante do extrato alcalino da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFAP	Fração precipitada do extrato alcalino da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFAP	Fração precipitada purificada do extrato alcalino da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFW	Extrato aquoso da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFW100R	Fração retida do extrato aquoso da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATFW100E	Fração eluente do extrato aquoso da folha da <i>A. tucumanensis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrópico derivado do cérebro (
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	Concentração letal 50%
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DEBT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEC	Etanólico da caule

EEF	Etanólico da folha
FAC	Fração acetato de etila caule
FAF	Fração acetato de etila folha
FCC	Fração clorofórmio caule
FCF	Fração clorofórmio folha
FHC	Fração hexano caule
FHF	Fração hexano folha
FRC	Fração remanescente do caule
FRF	Fração remanescente da folha
Fuc	Fucose
g	Gramas
Gal	Galactose
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
Glc	Glucose
H	Hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
IGF	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
KCl	Cloreto de Potássio
kg	Quilograma
kDa	Quilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
L	Litro
M	Molar
Man	Manose
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (concentração inibitória mínima)
mm	Milímetros
Mmol/L	Milimol por litro
m/v	Razão massa por volume

N	Normal
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Sulfito de sódio
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritroide 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PANC	Plantas alimentícias não convencionais
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PGC1- $\alpha$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
ppm	Partes por milhão
Ram	Ramnose
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
SIRT1	Sirtuina 1
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TFA	Ácido trifluoracético
TFC	<i>Total flavonoid content</i> (teor de flavonoides)
TPC	<i>Total phenolic content</i> (teor de fenólicos)
TPTZ	2,4,6- tripidil-s-tri-azine
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Razão volume por volume
Xy	xylose
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
mmol	Micromol

$\alpha$ -L-Ara       $\alpha$ -L-arabinose  
 $\beta$ -L-araf      Beta-L-arabinofuranose

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\delta$	Delta
$\beta$	Beta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1 OBJETIVOS .....	25
1.1.1 Objetivo geral .....	25
1.1.2 Objetivos específicos .....	26
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
2.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS .....	27
2.2 A ESPÉCIE VEGETAL .....	28
2.2.1 Família Basellaceae .....	28
2.2.2 O GÊNERO <i>Anredera</i> Juss. ....	29
2.2.3 A espécie <i>Anredera tucumanensis</i> (Lillo & Hauman) Sperling .....	32
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS E SAÚDE .....	32
2.4 POLISSACARÍDEOS E SAÚDE.....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 CLASSIFICAÇÃO E ETAPAS DA PESQUISA .....	37
3.2 MATERIAL BOTÂNICO .....	38
3.3 PREPARO DA AMOSTRA .....	38
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	39
3.4.1 Umidade .....	39
3.4.2 Cinzas .....	40
3.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH).....	40
3.4.4 Acidez titulável.....	40
3.4.5 Proteína.....	41
3.4.6 Lipídios.....	42
3.4.7 Fibras totais .....	42
3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	43
3.5.1 Rendimento dos extratos .....	44
3.6 DOSEAMENTOS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE .....	45
3.6.1 Doseamentos dos fenólicos totais.....	45
3.6.2 Doseamentos dos flavonoides .....	46
3.6.3 Propriedade antioxidante pela capacidade de redução do radical livre DPPH.....	46
3.6.4 Propriedade antioxidante por captura de radical livre ABTS.....	47

3.6.5 Propriedade antioxidante de redução do ferro (FRAP) .....	47
3.7 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA .....	48
3.8 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS .....	49
3.8.1 Cromatografia da fração hexano da folha (FHF).....	50
3.8.2 Isolamento do extrato etanólico da folha (EEF).....	50
3.8.3 Identificação dos compostos.....	51
3.9 TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH.....	52
3.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	53
3.10.1 Preparo do sangue.....	53
3.10.2 Preparo da amostra e controles.....	54
3.10.3 Realização do teste .....	54
3.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	56
3.12 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS .....	57
3.12.1 Material vegetal .....	58
3.12.2 Extração .....	58
3.12.3 Purificação .....	59
3.12.4 Análise estrutural dos polissacarídeos obtidos .....	61
3.12.4.2 Dosagem de ácidos urônicos .....	61
3.12.5 Teste de homogeneidade .....	62
3.12.6 Identificação dos polissacarídeos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	63
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	64
4.3 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	66
4.4 DOSEAMENTOS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE .....	67
4.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	71
4.6 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS .....	73
4.6.1 Fração hexano.....	73
4.6.2 Extrato etanólico.....	75
4.7 TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH.....	80
4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	82
4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	82

4.10 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	85
4.10.1 Polissacarídeos do extrato aquoso e frações.....	85
4.10.2 Polissacarídeos do extrato alcalino e frações .....	89
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES.....</b>	<b>111</b>
<b>APÊNDICE 2 – CURVAS ANALÍTICAS PARA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE E DOSEAMENTOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES .....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE 3 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTOS DE ÁCIDOS URÔNICOS.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO SISGEN .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 2 – REGISTRO DA ESPÉCIE VEGETAL NO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL.....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por sua ampla dimensão e biodiversidade, especialmente pelo clima favorável à adaptação das mais diversas espécies vegetais, muitas delas ainda desconhecidas ou negligenciadas (Brasil, 2015). Dentre as espécies nativas são encontradas as chamadas plantas alimentícias não convencionais (PANC). São vegetais de desenvolvimento espontâneo, comuns em jardins, hortas, quintais e até mesmo entre as calçadas de rua, mas que não fazem parte da rotina alimentar da população de um local, região ou país (Kinnupp; Lorenzi, 2014; Ranieri, 2017).

Muitas PANC brasileiras já foram descritas na literatura, despertando o interesse pela composição nutricional, fitoquímica e atividades biológicas (Ranieri, 2017; Carvalho; Conte-Junior, 2021). Foi a ausência de estudos com a *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, popularmente conhecida como bertalha crocante (Kinnupp; Lorenzi, 2014), que motivou essa pesquisa. É uma espécie do gênero *Anredera*, o mais representativo da família Basellaceae, presente do Sul dos Estados Unidos até a Argentina. No Brasil, além da *A. tucumanensis*, outras duas espécies ocorrem naturalmente: *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis e *Anredera marginata* (Kunth) Sperling (Christenhusz; Byng, 2016).

Ensaio prévios identificaram ação antimicrobiana, atividade antioxidante e a presença de metabólitos como flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos, terpenoides, carotenoides e fenóis em outras espécies da família Basellaceae, como a *Basella alba* L. (Azad *et al.*, 2013; Tongco; Añis; Tamayo, 2015; Adegoke; Ojo, 2017; Deka *et al.*, 2017). Quanto ao gênero *Anredera*, a espécie *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, também considerada uma PANC, lidera as publicações de propriedades antioxidante e biológica (Bari *et al.*, 2019; Alba; Tessaro; Sobottka, 2024). O uso empírico das folhas *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis foi associado ao efeito terapêutico de sintomas como febre, tosse, irregularidade no ciclo menstrual, úlcera na boca, doenças como diabetes e gota, além de serem utilizadas via alimentação como galactogogas (Panyaphu *et al.*, 2011; Srithi *et al.*, 2012; Rahayu; Araki; Rosleine, 2020).

O interesse pelo potencial antioxidante das plantas está relacionado desde os efeitos benéficos à saúde humana, até a aplicação em sistemas alimentares (Gulcin, 2020). Quanto à saúde, as ações antioxidante e anti-inflamatória de metabólitos de espécies vegetais foram associadas à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (Williams *et al.*, 2013; Cicero; Colletti, 2017; Chattopadhyay; Thirumurugan, 2018; Vásquez-Reyes *et al.*, 2021), e mais recentemente tem sido alvo de interesse na manutenção da homeostase do microbioma (Vos *et al.*, 2022;

Naliyadhara *et al.*, 2023). Na indústria alimentícia, o uso de antioxidantes como aditivos naturais em substituição aos sintéticos tem demonstrado eficácia no retardo da peroxidação lipídica e na redução da oxidação de aminoácidos, favorecendo o tempo de prateleira dos produtos e contribuindo para a manutenção das características organolépticas do alimento (Gulcin, 2020).

Além das ações benéficas à saúde, é importante ressaltar que os metabólitos secundários sintetizados por espécies vegetais podem apresentar riscos associados à toxicidade. Inalação, ingestão ou contato com plantas tóxicas podem causar reações como alergias na pele e mucosas, sintomas gastrintestinais, alterações respiratórias, cardiovasculares, neurológicas, podendo levar ao óbito. A avaliação da toxicidade confere segurança desde a ingestão das plantas, até o estabelecimento de doses seguras para o desenvolvimento de fitoterápicos ou fármacos, por exemplo (Niu; Dong; Niu, 2023; Paim *et al.*, 2023).

Outro grupo de compostos de grande interesse científico contempla os polissacarídeos, carboidratos que têm apontado importante contribuição para a saúde humana devido ação antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antihiperlipidêmica, antiglicação, antifadiga, imunomoduladora e função prebiótica (Sun *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021; Yarley *et al.*, 2021). Ensaios prévios identificaram polissacarídeos em espécies da família Basellaceae e no gênero *Anredera* (Zhang *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2022).

Diante da vasta biodiversidade nacional e da possibilidade de emprego alimentício e nutracêutico de muitas espécies vegetais subutilizadas, a apropriação do conhecimento e a disseminação das propriedades das PANC tem grande relevância no reequilíbrio ecológico, no resgate cultural e na valorização nutricional e fitoquímica desses produtos. Esse é o primeiro estudo a avaliar as características físico-químicas, atividades biológicas, toxicidade, potencial antimicrobiano e conteúdo de polissacarídeos da *A. tucumanensis*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Analisar a composição físico-química, o perfil fitoquímico, as atividades biológicas, a toxicidade preliminar e os polissacarídeos da espécie vegetal *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Coletar, identificar e registrar a espécie vegetal *A. tucumanensis*;
- Analisar o perfil físico-químico da folha e caule da *A. tucumanensis*;
- Obter extratos e frações da folha e caule da *A. tucumanensis*;
- Realizar *screening* fitoquímico dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar a propriedade antioxidante dos extratos e frações da folha e caule da *A. tucumanensis*;
- Avaliar o teor de fenólicos dos extratos e frações da folha e caule da *A. tucumanensis*;
- Avaliar o teor de flavonoides dos extratos e frações da folha e caule da *A. tucumanensis*;
- Caracterizar os compostos bioativos dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Extrair os polissacarídeos da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar a homogeneidade dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar o teor de urônicos dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Avaliar a composição monossacarídica dos extratos e frações da folha da *A. tucumanensis*;
- Identificar os polissacarídeos da folha da *A. tucumanensis*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS

Diversas plantas são popularmente denominadas “daninhas” ou “mato”, comumente de ocorrência espontânea em meio aos cultivos e até mesmo em locais pouco prováveis para o seu crescimento, como quintais, terrenos baldios, jardins, praças e frestas de calçada. Contudo, várias dessas espécies vegetais desprezadas pelo homem apresentam importância alimentícia (Kinnupp; Lorenzi, 2014).

Plantas alimentícias são aquelas que podem ser usadas integral ou parcialmente na alimentação humana. Partes essas como: raízes tuberosas, tubérculos, bulbos, rizomas, talos, folhas, brotos, flores, frutos, sementes, látex, resina, goma. Desse modo, as plantas alimentícias não convencionais (PANC) contemplam uma categoria de espécies incomuns para a maior parte da população de determinada região. Entre elas estão leguminosas, grãos, frutas e legumes capazes de se adaptarem a condições de seca e aos solos pobres em matéria orgânica e micronutrientes (Kinnupp; Lorenzi, 2014).

Em geral, as PANC no Brasil não são cultivadas, ocorrem de maneira natural em áreas antropizadas, florestas, cerrados e campos, e comumente não requerem muitos cuidados no cultivo (Kinnupp; Lorenzi, 2014). Geralmente são espécies com alta tolerância ao estresse climático, característica importante mediante às mudanças que tem alertado o planeta, como alterações bruscas na temperatura e o reduzido acesso à água (Baldermann *et al.*, 2016). No contexto ambiental, vale ressaltar que a agricultura moderna e convencional tem impactado na redução da biodiversidade e poluição do ecossistema (Willett *et al.*, 2019).

Além das questões ambientais, a agricultura convencional contribui para a monotonia alimentar. Praticamente 90% do alimento mundial é proveniente de apenas 20 espécies, um dado alarmante quando comparado às mais de 300.000 que compõem a biodiversidade global. O Brasil, por sua vez, detém a maior biodiversidade do mundo, porém é desconhecido quantas espécies são utilizadas no dia a dia, sem falar que o consumo alimentar do brasileiro muitas vezes é repleto de alimentos oriundos de outras regiões, especialmente da Europa, reforçando a subutilização das riquezas locais (Kinnupp; Lorenzi, 2014).

Diversos alimentos negligenciados, como as PANC, são fontes de macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos, e têm apresentado potenciais atividades como antioxidantes e antimicrobiana (Campanaro *et al.*, 2019; Milião *et al.*, 2022). Tendo em vista que a deficiência de determinadas vitaminas e minerais é uma realidade em muitas regiões do

mundo, e, a importância de diversos fitoquímicos na redução do risco de doenças, o consumo de PANC é relevante.

Poucas espécies nativas são encontradas nos mercados e feiras, e para gerar essa oferta é importante disseminar pesquisas e conhecimento sobre elas, instigando a demanda pela população (Kinnupp; Lorenzi, 2014; Campanaro *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2023). Um estudo realizado na região do Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul, avaliou o conhecimento e utilização de PANC e frutas nativas pela população local, sendo mais de 70% dos entrevistados residentes na zona rural. Os autores constataram que o consumo e o conhecimento das frutas regionais são mais prevalentes do que das PANC, possivelmente por serem mais atrativas e saborosas. Dentre as PANC, o dente-de-leão foi o mais citado segundo o conhecimento dos entrevistados, especialmente entre os indivíduos mais idosos (Polesi *et al.*, 2017).

Segundo Campanaro *et al.* (2019), um dos primeiros passos para a valorização das plantas não convencionais é o aprimoramento de técnicas adequadas para identificação das espécies. Por serem conhecidas através de nomes distintos segundo a região do país, a identificação assertiva contribui para a segurança do consumidor. Ações como essa podem viabilizar uma alternativa financeira para o pequeno agricultor, somada ao cuidado com a biodiversidade através da produção sustentável e na contribuição da melhoria do padrão alimentar da população. Uma revisão publicada em 2016 trata esses ingredientes negligenciados como “alimento do futuro” (Baldermann *et al.*, 2016).

Aporte nutricional, valorização dos produtos regionais, contribuição para o desenvolvimento socioeconômico local e sustentabilidade da agricultura parecem representar algumas das vantagens do conhecimento e uso das PANC.

## 2.2 A ESPÉCIE VEGETAL

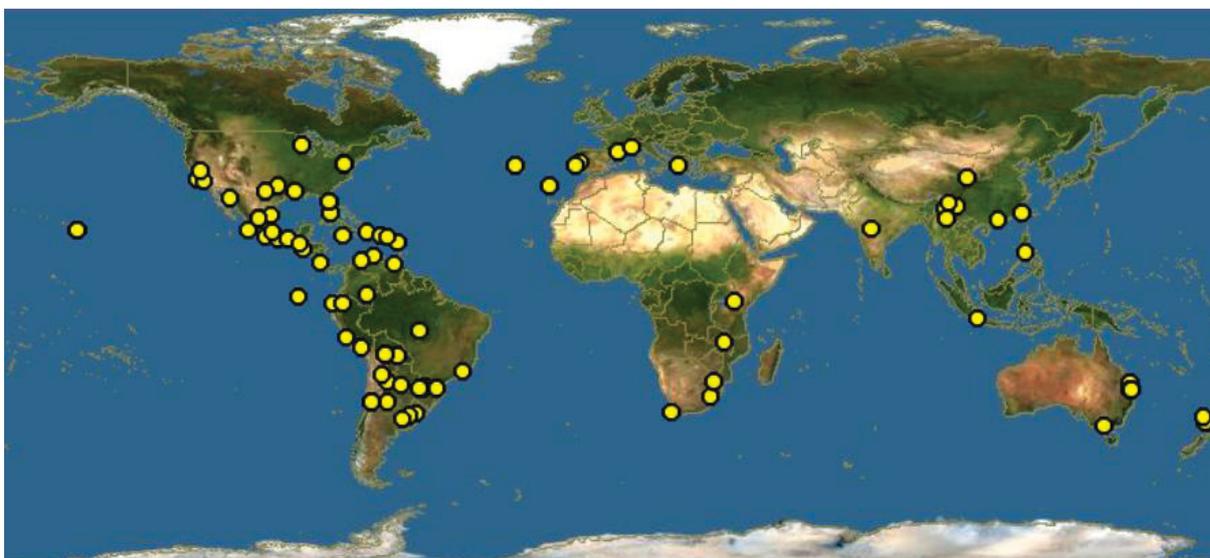
### 2.2.1 Família Basellaceae

A família Basellaceae, popularmente chamada de família da madeira, pertence ao grupo principal das angiospermas e contempla quatro gêneros: *Anredera* Juss., *Basella* L., *Tourtonia* Moq e *Ullucus* Caldas. É composta por trepadeiras volúveis, sem gavinhas, suculentas, herbáceas, de folhas alternas e flores pequenas dispostas em inflorescências, espécies predominantemente neotropicais e presentes do Sul dos Estados Unidos até a Argentina (Udulutsch *et al.*, 2007; WFO, 2024).

### 2.2.2 O GÊNERO *Anredera* Juss.

*Anredera* Juss, também conhecido como *Boussingaultia* Kunth, é o gênero mais expressivo da família Basellaceae. É nativo do Brasil e tem distribuição geográfica de Norte a Sul (FIGURA 1). Contempla doze espécies: *Anredera aspera* Sperling, *Anredera baselloides* Baill., *Anredera brachystachys* (Moq.) Sperling, *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, *Anredera densiflora* Sperling, *Anredera diffusa* (Moq.) Sperling, *Anredera floribunda* (Moq.) Sperling, *Anredera krapovickasii* (Villa) Sperling, *Anredera marginata* (Humb., Bonpl., & Kunth) Sperling, *Anredera ramosa* (Moq.) Eliasson, *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, *Anredera vesicaria* (Lam.) C.F.Gaertn. (Udulutsch *et al.*, 2007; WFO, 2024).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Anredera*



FONTE: Discoverlife (2023)

*A. cordifolia* é uma planta alimentícia não-convencional popularmente conhecida como bertalha-coração ou videira da madeira, a espécie mais investigada do gênero. Nativa do Brasil, se difere de maioria das trepadeiras da família por apresentar tubérculos axilares, que são bulbilhos comestíveis e fonte de interesse nas pesquisas (Kinnupp; Lorenzi, 2014; GBIF, 2023).

Uma das principais propriedades da *A. cordifolia* é anti-diabética. Ao testar o extrato etanólico das folhas em ratos, foi verificado que 50 mg/kg de peso corporal foi capaz de reduzir a glicemia dos animais e regular o metabolismo dos ácidos graxos, indicando um potencial para desenvolvimento de terapias alternativas no diabetes (Dwitiyanti *et al.*, 2021). Em outro estudo, foram testados extratos etanólicos das folhas em diferentes concentrações (50%, 70% e 96%),

sendo que a maior concentração promoveu inibição da alfa-glicosidase, redução da glicemia nos ratos testados e melhora na função das células beta de Langerhans (Kusriani *et al.*, 2023).

Muitos estudos científicos com plantas medicinais partem da necessidade de comprovar elementos que justifiquem o uso empírico. Conforme mencionado anteriormente, a *A. cordifolia* é a espécie mais estudada do gênero *Anredera*. Esse dado também foi relatado por um estudo que investigou, com especialistas da comunidade de Caeté-Açu (fronteira com o Parque Nacional da Chapada Diamantina), o uso tradicional de PANC como remédio. Nessa oportunidade a *A. cordifolia* foi a mais citada, e o uso popular foi associado ao fortalecimento do corpo, regulação intestinal e problemas estomacais (Medeiros *et al.*, 2021). Ao entrevistar praticantes da medicina tradicional na África do Sul, o uso dos bulbilhos combinado com outras plantas foi associado ao tratamento de gonorreia, clamídia, sífilis, HIV/SIDA e verrugas genitais (Maema; Potgtier; Samie, 2019).

Uma revisão publicada em 2022 destacou o efeito anti-inflamatório da *A. cordifolia* justificado por mecanismos que incluem a inibição da hemólise, de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, assim como diminuição no número de neutrófilos polimorfonucleares. O mesmo estudo salientou a variedade de metabólitos identificados nessa espécie vegetal, como saponinas, fenólicos, triterpenoides, esteroides, taninos e alcaloides (Firdaus; Ifora, 2022). Astuti *et al.* (2011) encontraram saponinas triterpenoides e esteroides em todas as partes da planta: caule, folhas e bulbilhos, atribuindo a esses compostos as possíveis aplicações medicinais no diabetes, hepatopatias, hipertensão e hipercolesterolemia.

A ação cicatrizante da *A. cordifolia* foi verificada em alvéolos dentários ratos Wistar no pós-extração. O gel do extrato da folha a 3% acelerou o fechamento da ferida, o que pode estar associado ao aumento da proliferação de fibroblastos, osteoblastos e osteócitos (Hanafiah *et al.*, 2021). Outra espécie da mesma família, a *Aredera difusa*, também é usada popularmente por comunidades do Peru como cicatrizante, que se dá por aplicação tópica do filtrado da infusão das folhas (Villegas *et al.*, 1997).

Apesar da maioria dos ensaios testarem o extrato etanólico das folhas da *A. cordifolia*, um estudo brasileiro avaliou a composição do óleo essencial por meio das análises de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Foram identificados 19 compostos, sendo mais de 67% da composição correspondente ao teor de hidrocarbonetos. Nessa mesma pesquisa foi verificada atividade alelopática do óleo essencial, que promoveu a germinação da *Spergula. arvensis*. Nos testes antimicrobianos, o óleo essencial não inibiu patógenos gram-positivos (Souza *et al.*, 2014). Por outro lado, o

extrato etanólico das folhas demonstrou ação anti-microbiana para *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia. coli* e *Bacillus cereus* (Garmanaa; Sukundara; Fidriannya, 2014)

Devido ao aumento da longevidade humana, estudos de neurociência têm buscado recursos que possam reduzir o comprometimento da aprendizagem e da memória com o avanço da idade. Ao testar o efeito do extrato das folhas da *A. cordifolia* em ratos, foi possível verificar melhora nos níveis de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica no hipocampo, como o fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF). Esse estudo preliminar sugere que essa espécie vegetal pode ser um recurso na melhora da memória e do aprendizado, minimizando efeitos de medicações alopáticas (Sumiyoshi *et al.*, 2021).

A influência da atividade antioxidante do extrato das folhas de *A. cordifolia* na redução do risco de cataratas, uma das principais causas de cegueira do mundo e prevalente em indivíduos idosos, foi analisado em lentes de cabras pela dosagem do malondialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo. Foi verificada uma redução nos níveis de MDA nas amostras tratadas com a espécie, resultado atribuído pelos autores ao seu alto teor de flavonoides e outros compostos com ação antioxidante (Feriyani *et al.*, 2021).

Não são apenas os metabólitos que proporcionam interesse pelo gênero *Anredera*. Na busca de compostos naturais com propriedade antiadesivas para tratamento contra *Helicobacter pylori*, polissacarídeos foram isolados do caule da *A. cordifolia* via extração aquosa. Os autores identificaram a presença de L-arabinose, D-galactose, ramnose, e ácido galacturônico (Nguyen *et al.*, 2022).

Aplicabilidades farmacêutica e alimentícia também foram documentadas. O uso do extrato das folhas da *A. cordifolia* foi utilizado para modificação de nanopartícula de quitosana no encapsulamento de azitromicina, o que parece ter atuado para melhor eficiência no encapsulamento do fármaco e na sua capacidade de carreamento (Yuniarti; Yulizar, 2023). Na produção de alimentos, a adição do pó das folhas de *A. cordifolia* às rações de 200 codornas teve como objetivo melhorar a produção e a qualidade dos ovos. Com apenas 2% da planta adicionada à alimentação na rotina dos animais, as gemas dos ovos produzidos apresentaram menores níveis de colesterol (Kismiati *et al.*, 2020)

*A. vesicaria* ou *A. leptostachys*, outra espécie do gênero *Anredera*, foi fruto de investigação há mais de 2 décadas. Assim, como a *A. cordifolia*, a *A. vesicaria* é popularmente usada como anti-inflamatória e analgésica em comunidades residentes em Cuba e na República Dominicana. Em 1998 um grupo de pesquisadores testou o extrato dos tubérculos na inflamação aguda e na toxicidade em modelo animal. Foi possível observar que, além da baixa toxicidade,

o extrato usado tanto via oral como tópica demonstrou potencial efeito anti-inflamatório (Saénz; García; Fernández, 1998).

### 2.2.3 A espécie *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling

Dentre as espécies do gênero *Anredera* Juss. se encontra a *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, popularmente chamada de bertalha crocante e sinónimas *Boussingaultia tucumanensis* Hauman & Irigoyen, *Boussingaultia tucumanensis* Lillo & Hauman e *Boussigaultia tucumanensis* ver. *Brasiliensis* Hauman (Kinnupp; Lorenzi, 2014; WFO, 2024). Ocorre naturalmente na Argentina, Brasil, Colômbia e Equador. No Brasil foi registrada nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Pellegrini; Sakuragui, 2017). No Paraná, *A. tucumanensis* foi encontrada em borda e clareiras de florestas preservadas, formando grandes populações com ramagens que atingem a copa das árvores (Nunes *et al.*, 2015).

*A. tucumanensis* é uma herbácea volúvel, apresenta caule cilíndrico, estriado, levemente sulcado, sem formação de bulbilhos. Folhas alternas, pecioladas, elíptica ovaladas ou oblongo lanceoladas, carnosas, crássulas a subcrássulas, base longo atenuada, margens inteiras a crenuladas, ápice agudo ou atenuado. Inflorescências paniculadas, raque levemente sulcada; brácteas basais, setáceas a oval lanceoladas, base truncada, margens denteadas, ápice agudo, decíduas. Flores alvas, elípticas, ápice arredondado, base truncada e unida formando uma estrutura cupuliforme, persistentes sépalas elípticas, ápice arredondado, estilete único. Fruto e semente não observados (Udulutsch *et al.*, 2007; Nunes; *et al.*, 2015).

Planta de crescimento espontâneo em beira de matas, capoeiras e sobre árvores das suas regiões de origem. Trata-se de uma hortaliça folhosa rústica e tolera geadas, fator que pode justificar sua ocorrência em regiões serranas do Sudeste e Sul do Brasil. As folhas da *A. tucumanensis* podem ser consumidas como verdura, após cocção, além de ser uma espécie com efeito decorativo (Kinnupp; Lorenzi, 2014).

## 2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS E SAÚDE

O papel de diversos nutrientes e compostos bioativos na redução do risco de doenças, bem como no tratamento de algumas delas, tem sido estudado há algumas décadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) substâncias bioativas são “os nutrientes e

não nutrientes consumidos normalmente como componente de um alimento, que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano” (Brasil, 2019b).

O Brasil abriga diversas espécies ricas em metabólitos na extensão dos seis biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal. Frutas e plantas nativas de cada uma dessas regiões demonstraram abundante composição de metabólitos primários e secundários. As investigações científicas sugerem promissoras aplicações desses compostos como matéria-prima de fármacos para tratamento de câncer, por exemplo, dado o potencial antioxidante e a capacidade de otimizar a expressão de enzimas de destoxificação (Carvalho; Conte-Junior, 2021).

Em tempo que a longevidade é um tema de interesse nas ciências da saúde, pesquisas que relacionam o uso de plantas com o propósito de “antienvelhecimento” ganham força e relevância. O processo de envelhecimento muitas vezes é acompanhado por complicações como obesidade central, diabetes, hipertensão, cardiopatias, miopatias, câncer. Plantas como açaí, canela, cardo-mariano, cúrcuma, mirtilo, romã, *Rhodiola rósea*, sasa e tantas outras foram associadas com possíveis efeitos positivos na redução dos danos comuns na senescência. Dentre os mecanismos de ação propostos cabe citar o efeito na via de sinalização dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) e, mais uma vez, a defesa antioxidante (Chattopadhyay; Thirumurugan, 2018).

É também com a terceira idade que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, potenciais responsáveis pela morbimortalidade em todo o mundo. Apesar da etiologia dessas patologias não estar completamente elucidada, um dos mecanismos parece envolver o estresse oxidativo, uma vez que o excesso de radicais livres atua como gatilho na degeneração e morte neuronal. Não é por acaso que a modulação do fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) tem sido alvo dos estudos, pois se trata de uma via de indução da expressão de proteínas antioxidantes. Compostos como a naringenina, curcumina, sulforafanos, piperina, ácido elágico, resveratrol, sasaminol demonstraram alguma contribuição no estímulo dessa via bioquímica (Bai; Bian; Zhang, 2023).

Pesquisar e discutir elementos potencialmente redutores dos fatores de riscos para as doenças cardiovasculares também parece providencial. Uma das revistas mais conceituadas no meio científico destaca que os eventos cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo entre adultos de 35 a 70 anos. Além desses dados, provenientes da pesquisa PURE (*Prospective Urban Rural Epidemiology*), destaca-se a crescente e prevalente mortalidade causada por câncer em diversas regiões do planeta (Dagenais *et al.*, 2020).

É preciso pensar e investir em prevenção, em recursos que possibilitem melhorar a situação da saúde pública. Dentre os fatores contribuintes, os alimentos têm um papel comprovadamente fundamental, seja pelos seus nutrientes e/ou metabólitos. Chá verde, arroz vermelho, polifenóis do cacau, berberina, curcumina e isoflavonas são exemplos de alimentos e compostos bioativos que parecem colaborar na redução do risco de mortalidade por eventos cardiovasculares (Cicero; Colletti, 2017).

A obesidade, problema crescente em âmbito global e responsável pelo desencadeamento de diversas outras doenças crônicas não transmissíveis, deve ser um dos alvos na melhoria do estado de saúde desde a infância até a vida adulta. Hábitos de vida que incluam o consumo adequado de fitoquímicos parece ser uma estratégia anti-obesogênica, seja influenciando no ciclo de vida do adipócito até a atividade anti-inflamatória desses compostos (Williams *et al.*, 2013). Em se tratando de ação anti-inflamatória, o trabalho de (Gandhi *et al.* (2022) verificou o potencial de extratos de plantas como agentes naturais também favoráveis ao tratamento de artrite reumatoide e de doença autoimune de caráter inflamatório.

Outra abordagem terapêutica que tem sido atribuída aos metabólitos quando o assunto são as doenças metabólicas, como a obesidade, é a capacidade de realizarem modulação da função mitocondrial. Uma vez que as mitocôndrias são responsáveis pela maior parte da produção de energia nas células a partir dos macronutrientes, otimizar sua síntese e funcionamento parece interessante para potencializar o uso de substratos na produção de ATP (adenosina trifosfato), especialmente os ácidos graxos. Mecanismos de ação propostos permeiam a ativação de proteína quinase ativada por monofosfato-adenosina (AMPK), da sirtuina 1 (SIRT1) e do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC1-  $\alpha$ ), e a literatura associa esses estímulos ao uso de genisteína, epicatequinas, quercetina, resveratrol, antocianinas, ácido clorogênico e ácido cinâmico (Vásquez-Reyes *et al.*, 2021).

Investigar a composição de espécies vegetais pouco exploradas, tal qual propõe o presente estudo, é um trajeto importante rumo a potenciais descobertas que possam contribuir para uma melhor saúde e qualidade de vida da população. Segundo Valli, Russo e Bolzani (2018), apesar de terem ganhado força nos grupos de estudos, há uma subutilização dos produtos naturais e especialmente das plantas medicinais da biodiversidade brasileira.

## 2.4 POLISSACARÍDEOS E SAÚDE

Polissacarídeos são carboidratos compostos por pelo menos vinte até milhares de unidades monoméricas. Eles se diferem entre si segundo seus tipos e número de

monossacarídeos, tipo de ligações glicosídicas e grau de ramificação. Segundo os monômeros, podem ser classificados em homopolissacarídeos (aqueles formados por apenas um tipo de monossacarídeo, como o amido), ou heteropolissacarídeos (que contém dois ou mais tipos). Quanto à solubilidade, são classificados em solúveis ou insolúveis em água. As diferentes funções dos polissacarídeos, portanto, dependem de suas características, como componente estrutural (celulose, hemicelulose, pectina), reserva energética (amido e glicogênio) e molécula de sinalização (ágar, mucopolissacarídeos) (Belitz, Grosh, Schieberle, 2009; Nelson; Cox, 2019).

As fibras dietéticas, polissacarídeos não digeríveis pelas enzimas humanas, são categorizadas em solúveis e insolúveis. As insolúveis (celulose, hemicelulose, lignana) são conhecidas, dentre outras funções, por darem volume ao bolo fecal. As fibras solúveis (pectinas, gomas, mucilagens) são metabolizadas por determinadas bactérias intestinais que promovem a síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e esses compostos têm relação com efeitos fisiológicos benéficos. Dessa forma, alguns polissacarídeos exercem efeito prebiótico, capazes de contribuir para a regulação da microbiota intestinal (Sun *et al.*, 2020; Guan; Yu; Feng, 2021; Song *et al.*, 2021).

Especialmente nas últimas décadas a ciência tem investido em pesquisas com foco na saúde do intestino, uma vez que o microbioma apresenta relação importante com diversos sistemas fisiológicos. Uma microbiota saudável e íntegra passa pela redução do risco de patologias intestinais até o tratamento e a prevenção de doenças neurodegenerativas, uma vez que favorece o funcionamento do eixo intestino-cérebro. A contribuição dos polissacarídeos de plantas nesse sistema inclui o aumento na proporção de bifidobactérias, redução das cepas patogênicas e, conseqüentemente melhora na integridade da barreira intestinal. Essa cascata de ações leva, portanto, a um melhor controle do sistema imunológico intestinal via expressão de citocinas anti-inflamatórias (Sun *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2023).

Outra atividade biológica extensivamente estudada dos polissacarídeos, como aqueles chamados solúveis não amido, é a ação antioxidante. Essa atividade está associada à sinalização de enzimas envolvidas nas vias antioxidantes endógenas, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAP) e glutatona peroxidase (GSH-Px), especializadas na neutralização de radicais livres como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxido lipídico (Tan; Zhou; Chen, 2017; Yarley *et al.*, 2021; Mu; Yang; Huang, 2021).

Uma revisão publicada em 2021 levantou dados sobre a influência dos polissacarídeos na melhora dos parâmetros de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, diabetes e síndrome metabólica (Song *et al.*, 2021). Além da imunomodulação e atenuação dos radicais

livre, atividades antimicrobiana, anticâncer, antihiperlipidêmica, antiglicação, antifadiga e até antienvhecimento são atribuídas à inúmeros polissacarídeos (Yarley *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2023).

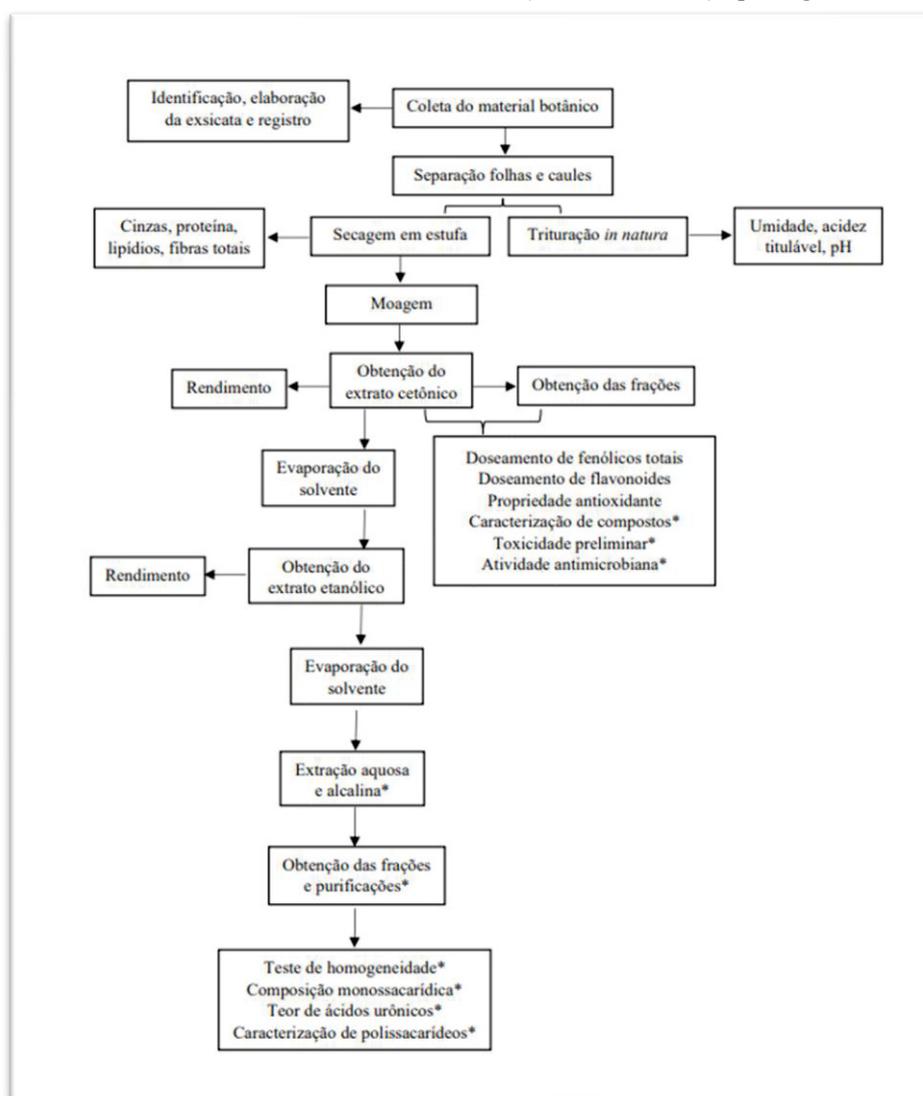
A relevância dos polissacarídeos não se restringe aos benefícios à saúde. Na indústria alimentícia eles possuem muitas aplicabilidades devido sua capacidade em formar gel, como agentes estabilizantes para emulsões e na formação de filmes protetores dos alimentos (Olawuyi; Kim; Lee, 2021). Sabendo das inúmeras atividades atribuídas aos polissacarídeos e que, especialmente aquelas biológicas dependem da sua estrutura química (Tan; Zhou; Chen, 2017), justifica-se a relevância de estudos capazes de identificar esses nutrientes nas mais diversas espécies vegetais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CLASSIFICAÇÃO E ETAPAS DA PESQUISA

Pesquisa de caráter experimental, abrangendo análises laboratoriais para caracterização da composição físico-química, análise do perfil fitoquímico, das atividades biológicas, toxicidade e identificação dos polissacarídeos da espécie vegetal *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling. Esse estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AA7DEF6 (ANEXO 1). A FIGURA 2 sintetiza as etapas executadas na pesquisa.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DA PESQUISA REALIZADA COM A ESPÉCIE VEGETAL *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling



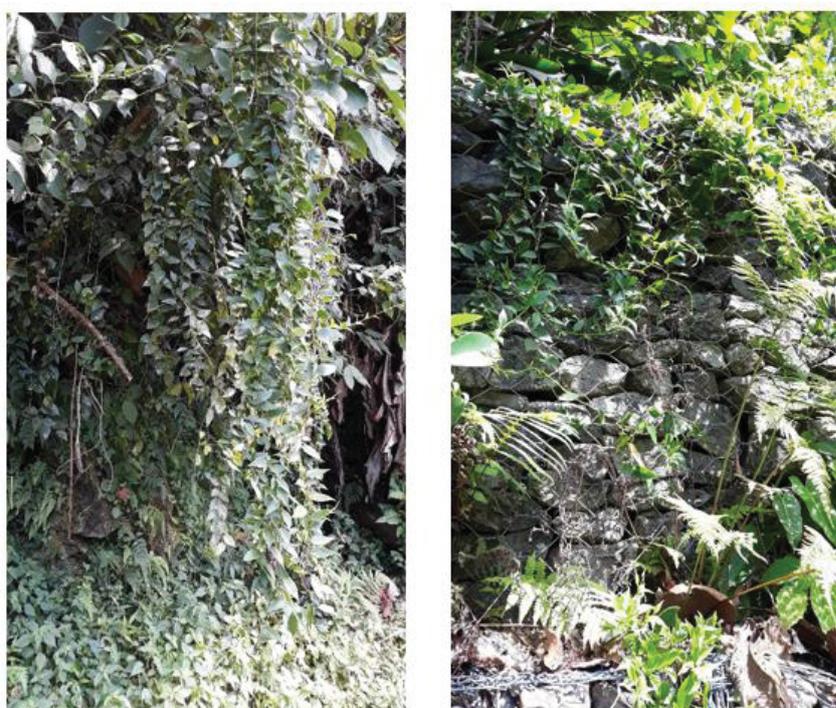
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: \* ensaios realizados apenas com as folhas.

### 3.2 MATERIAL BOTÂNICO

As coletas da *A.tucumanensis* (FIGURA 3) foram realizadas em novembro de 2018 e janeiro de 2020 na região serrana do município de Morretes, Estado do Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°20'52.0"S 48°53'06.7"W. O material botânico foi submetido à identificação no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba.

FIGURA 3 – LOCAL DA COLETA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis* NA SERRA DA GRACIOSA, MUNICÍPIO DE MORRETES, PARANÁ



FONTE: A autora (2024).

### 3.3 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras da *A.tucumanensis* foram levadas ao Laboratório de Pós-Graduação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde folhas e caule foram manualmente selecionados e separados. Foram descartados materiais oxidados, partes danificadas, atacadas por fungos ou insetos, e demais resíduos orgânicos.

Parte do material *in natura* foi triturado e utilizado para algumas análises físico-químicas e o restante da amostra foi acondicionado em estufa (FIGURA 4a) e submetido à

secagem a uma temperatura de 45°C (FIGURA 4b). O material seco foi moído em triturador forrageiro Trapp® e armazenado em saco de polietileno devidamente identificado (FIGURA 4c).

FIGURA 4 – ETAPAS DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE FOLHAS E CAULES DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – folhas e caule acondicionados em estufa; b – folhas secas; c – folhas secas trituradas.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas da folha e caule da *A. tucumanensis* foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos, localizado no Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná. Para os ensaios de umidade, pH e acidez titulável foi utilizada a amostra fresca e os demais foram conduzidos a partir de matéria seca.

#### 3.4.1 Umidade

A umidade das amostras foi determinada, em triplicata, mediante secagem direta em estufa segundo a metodologia proposta pela Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (Brasil, 2019a). Aproximadamente 5 gramas de amostra fresca homogeneizada foram submetidas à estufa de circulação de ar da (Quimis®, Brasil) a 105°C, em pesa-filtro previamente padronizado, até apresentar peso constante. O valor da umidade foi representado pela diferença entre o peso da amostra seca e o peso do pesa-filtro (FIGURA 5a).

### 3.4.2 Cinzas

As cinzas foram analisadas mediante calcinação da matéria orgânica (Brasil, 2019a). Cerca de 3 gramas de amostra seca foram pesadas em cadinho previamente padronizado (FIGURA 5a) e levadas à secura e carbonização em chapa elétrica (FIGURA 5b). Em seguida as amostras foram incineradas em mufla (Fornitec®, Brasil) a 550°C até a queima total da matéria orgânica. Após resfriamento em dessecador, o teor de cinzas foi determinado pela diferença entre a amostra incinerada e o peso do cadinho. A análise foi realizada em triplicata.

FIGURA 5 - ANÁLISE DE UMIDADE E CINZAS DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – aferição do peso para cálculo do teor de umidade; b – carbonização das amostras para análise do teor de cinzas.

### 3.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

A determinação do pH foi por método eletrométrico. Aproximadamente 10 gramas de amostra fresca homogeneizada foram diluídas em 100 ml de água destilada e, após calibrado, o pHmetro (Analyser® modelo pH300, Brasil) foi utilizado para a indicação do pH (Instituto Adolfo Lutz (IAL), 2008). A análise foi realizada em triplicata.

### 3.4.4 Acidez titulável

A acidez titulável foi verificada através de volumetria potenciométrica conforme metodologia descrita pelo IAL (2008). Foram diluídas 5 gramas da amostra fresca em 150 mL

de água destilada para posterior titulação com hidróxido de sódio a 0,1M. Prosseguiu-se com a titulação até a solução atingir um pH entre 8,2 e 8,4, aferido com pHmetro (Analyser® modelo pH300, Brasil) previamente calibrado. A análise foi realizada em triplicata e, os valores de acidez foram expressos em % de acidez em ácido cítrico.

### 3.4.5 Proteína

A análise de proteínas foi realizada pela determinação de nitrogênio pelo processo de digestão de Kjeldahl. Um grama da amostra seca foi submetida à digestão com ácido sulfúrico e catalisador (FIGURA 6a), formando sulfato amoniacal. Após esse procedimento, foi realizada a destilação (destilador Solab®, SL-74, Brasil) por arraste de vapor de amônia. A amostra foi recebida em enlermeyer contendo ácido bórico a 4%, o que conferiu coloração verde à solução (FIGURA 6b). Por último, a amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,02M até obtenção da primeira coloração cor-de-rosa. A determinação do teor de proteínas das amostras foi realizada mediante aplicação da equação (1), utilizando o valor de 6,25 como fator de conversão (IAL, 2008).

FIGURA 6 - ANÁLISE DO TEOR DE PROTEÍNA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – digestão de nitrogênio para análise do teor de proteínas; b – amostra na coloração verde após adição de ácido bórico e amostra na colocação cor-de-rosa após titulação com ácido sulfúrico.

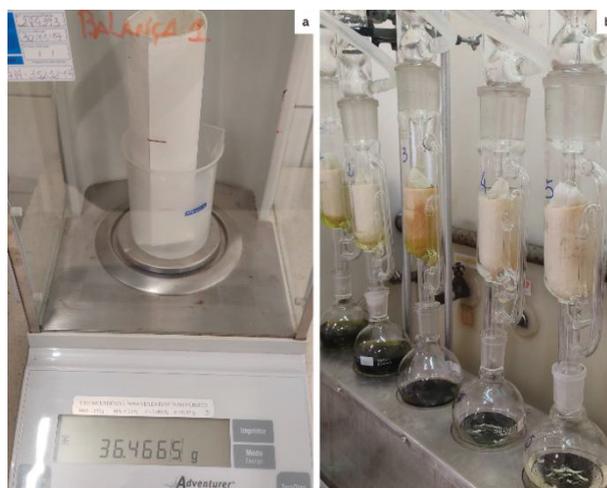
$$\text{Teor proteico (\%)} = \frac{\text{volume de ácido sulfúrico} \times 0,14 \times \text{fator de correção}}{\text{peso da amostas}} \quad (1)$$

FONTE: Instituto Adolfo Lutz (2008)

### 3.4.6 Lipídios

Os lipídios foram analisados mediante extração da amostra a quente com éter de petróleo (AOAC, 2005). Cerca de 5 gramas de amostra seca foram pesados em papel filtro (FIGURA a) e levados ao extrator de Soxhlet acoplado em um condensador de bolas e balão de fundo chato previamente padronizado, sendo a extração realizada por aproximadamente 8 horas (FIGURA b). O éter de petróleo foi destilado e o balão com o resíduo etéreo foi levado à estufa para secagem. Após resfriamento em dessecador, foi aferido o peso do final do balão. O teor de lipídios foi obtido pela diferença de peso do balão padronizado e o balão com o extrato etéreo.

FIGURA 7 - ANÁLISE DO TEOR DE LIPÍDIO DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – pesagem da amostra em papel filtro; b – extração de lipídios em Soxhlet.

### 3.4.7 Fibras totais

O teor de fibra alimentar total foi quantificado pelo método enzimático gravimétrico (Instituto Adolfo Lutz, 2008), o qual se constitui em digerir a amostra com três enzimas: alfa-amilase termorresistente, alcalase e amiloglusidase (Sigma®). Após digestão enzimática, 250 mL de etanol 95% foram adicionados à amostra e a solução permaneceu em repouso por 24 horas. Essa solução foi filtrada a vácuo em cadinhos de vidro padronizados e lavada com 30 mL de etanol 78%, 20 mL de etanol 95% e 20 mL de acetona. O resíduo que permaneceu nos cadinhos foi submetido à secagem em estufa (Quimis®, Brasil) a 105°C e, após resfriar em

dessecador, foi aferido o peso final. A análise foi realizada em duplicata e o teor de fibras calculado pela equação (2).

$$\text{FAT (\%)} = \frac{\text{R} - \text{P} - \text{C} - \text{B}}{\text{M} \times 100} \quad (2)$$

FONTE: Instituto Adolfo Lutz, 2008

NOTA: FAT – fibra alimentar total; R – resíduo das amostras; P – teor de proteína no resíduo; C – teor de cinzas no resíduo; B – branco da reação; M – peso da amostra analisada.

### 3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos foram obtidos em aparelho Soxhlet (Carvalho *et al.*, 2009). As amostras foram pesadas previamente ao acondicionamento no Soxhlet (FIGURA a). Foi adicionada acetona como solvente extrator (4 L), e a extração foi conduzida sob refluxo em manta aquecida, por um período aproximado de 72 horas. O volume dos extratos obtidos foi aferido com o auxílio de uma proveta, então foram filtrados em papel filtro 80g/m<sup>2</sup> (FIGURA b), e concentrados em evaporador rotatório a 60°C até 1/3 do seu volume inicial (FIGURA c), gerando o extrato cetônico da folha (ECF) e o extrato cetônico do caule (ECC).

FIGURA 8 - PREPARO DO EXTRATO CETÔNICO DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – obtenção do extrato cetônico em Soxhlet; b – filtragem do extrato cetônico; c – concentração do extrato cetônico em evaporador rotatório.

Parte do ECF e do ECC foram levados para secagem em banho-maria a 30°C, e outra parte submetida a partição líquido-líquido em aparelho Soxhlet sob refluxo em manta aquecida,

utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Cada extração teve uma duração média de 12 horas. As frações foram denominadas segundo a inicial do termo fração, do solvente extrator e da parte da planta: fração hexano folha (FHF), fração clorofórmio folha (FCF) (FIGURA a), fração acetato de etila folha (FAF), fração hexano caule (FHC), fração clorofórmio caule (FCC), fração acetato de etila caule (FAC).

Os extratos obtidos foram levados ao banho-maria a 30°C até completa secagem. O resíduo remanescente das extrações também foi seco e recebeu o nome de fração remanescente da folha (FRF) e fração remanescente do caule (FRC).

FIGURA 9 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO CETÔNICO DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – obtenção da fração hexano em Soxhlet; b – obtenção da fração clorofórmio em Soxhlet.

Após a extração inicial com acetona, o resíduo das amostras foram novamente submetidos a extração em Soxhlet por aproximadamente 72 horas, mas dessa vez utilizando o etanol como solvente. À esses extratos deu-se o nome de extrato etanólico da folha (EEF) e extrato etanólico da caule (EEC).

### 3.5.1 Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos cetônico e etanólico foi calculado a partir da determinação dos sólidos, que consistiu em adicionar 1 mL de extrato a uma placa de Petri previamente dessecada e levado a secar em estufa a 105°C até peso constante. A diferença do peso inicial e final da placa correspondeu ao teor de sólidos por mL de extrato. O cálculo do rendimento do extrato em relação ao material vegetal foi conduzido pela aplicação da equação (3).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{teor de sólidos por mL de extrato} \times 100}{\text{teor de planta por mL de extrato}} \quad (3)$$

Para calcular o rendimento das frações foi considerado o peso final das frações secas em relação à quantidade de extrato cetônico utilizado.

### 3.6 DOSEAMENTOS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

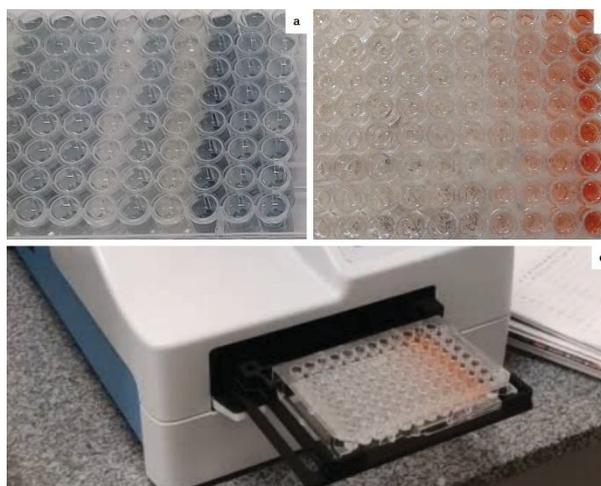
Foi realizado o doseamento de fenólicos totais segundo a metodologia de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965), e o doseamento de flavonoides pelo método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). A propriedade antioxidante foi mensurada pelos métodos do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) segundo Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), pela captura do radical livre ABTS conforme Re *et al.* (1999), e pelo poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), conforme proposto por Benzie e Strain (1997).

Para a realização de todas as análises supracitadas, os extratos e frações foram solubilizados em metanol nas proporções de 1:1 e 10:1 (m/v), que foram testadas em octuplicata. Os ensaios foram adaptados para microplacas de 96 poços seguindo as modificações propostas por Hornung *et al.* (2020), e as leituras foram feitas usando um leitor de microplacas (Multiskan™ Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Osaka, Japão).

#### 3.6.1 Doseamentos dos fenólicos totais

Nos poços da microplaca foram adicionados 240 µL de água destilada, 10 µL de amostra e 15 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após incubação por 3 minutos foram adicionados 15 µL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Passados 60 minutos em repouso no escuro foi realizada a leitura da microplaca a 690 nm (FIGURA a) (Singleton; Rossi, 1965). A curva padrão foi preparada pela diluição seriada de solução de ácido gálico e MeOH a uma concentração de 1 mg/mL ( $y = 0,4949x - 0,0316$ ;  $R^2 = 0,99$ ) (APÊNDICE 1). Os resultados foram expressos em mg de equivalente ácido gálico por 100 mg da amostra.

FIGURA 10 - DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS E DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – curva padrão ácido gálico para doseamento de teor de fenólicos totais; b – curva padrão quercetina para doseamento de teor de flavonoides; c – leitura da microplaca para doseamento de teor de flavonoides.

### 3.6.2 Doseamentos dos flavonoides

Foram adicionados aos poços da microplaca 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 90  $\mu\text{L}$  de nitrito de sódio 5% ( $\text{NaNO}_2$ ), em seguida incubada por 5 min. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% e novamente a microplaca foi incubada por 5 min. Foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e a microplaca permaneceu 60 minutos em repouso no escuro (Zhishen; Mengcheng; Jianming, 1999). Foi prepara uma solução de catequina e MeOH na concentração de 1 mg/mL e a diluição seriada na microplaca (FIGURA b) compôs a curva padrão do ensaio ( $y = 2,7231x - 0,11$ ;  $R^2 = 0,99$ ) (APÊNDICE 1). A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm (FIGURA c). Os resultados foram expressos em mg de equivalente catequina por 100 mg da amostra.

### 3.6.3 Propriedade antioxidante pela capacidade de redução do radical livre DPPH

Uma solução de DPPH• 0,12 mmol/L foi preparada e 190  $\mu\text{L}$  adicionados nos poços da microplaca, juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de amostra (Brand-Willians; Cuvelier; Berset, 1995). Após 30 minutos em repouso no escuro a absorbância foi medida em 515 nm (FIGURA a), e nesse ensaio o padrão utilizado foi o Trolox ( $y = -1,9879x + 2,0643$ ;  $R^2 = 0,9917$ ) (APÊNDICE 2). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por 100 mg da amostra.

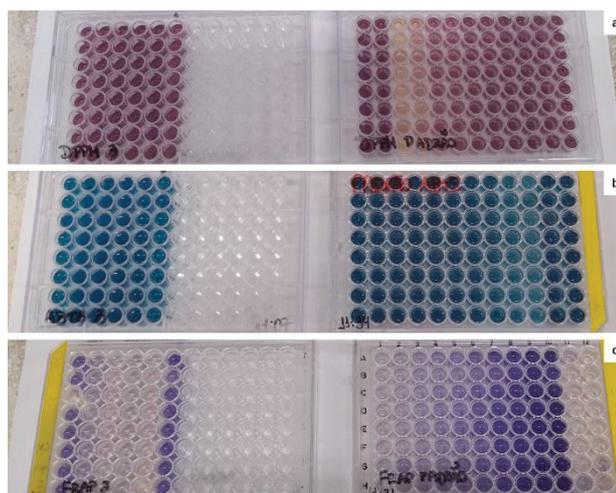
### 3.6.4 Propriedade antioxidante por captura de radical livre ABTS

Foram adicionados aos poços da microplaca 300  $\mu\text{L}$  de solução ABTS $\cdot$  e 10  $\mu\text{L}$  de amostra. Como padrão, foi utilizado o Trolox ( $y = -1,2291x + 2,5546$ ;  $R^2 = 0,9926$ ) e curva está apresentada no APÊNDICE 2. Após 30 minutos em repouso no escuro a absorbância foi medida em 590 nm (FIGURA b) (Re *et al*, 1999). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por 100 mg da amostra.

### 3.6.5 Propriedade antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Foi preparada a solução FRAP contendo solução tampão, solução de cloreto férrico e solução de 2,4,6- tripidil-s-tri-azine (TPTZ), permanecendo protegida da luz. Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  dessa solução foi adicionada à microplaca, juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de amostra (Benzie; Strain, 1997).. Após 30 minutos em repouso no escuro a absorbância foi medida em 570 nm (FIGURA c). Trolox foi utilizado como padrão ( $y=1,0173x - 0,089$ ;  $R^2 = 0,9918$ ) (APÊNDICE 2) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por 100 mg da amostra.

FIGURA 11 - ANÁLISE DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DPPH $\cdot$ , ABTS $\cdot$  e FRAP DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

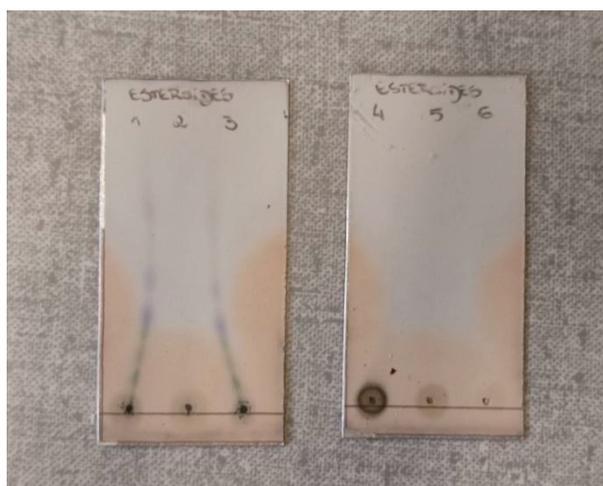
NOTA: a – microplacas da análise da propriedade antioxidante pelo método de captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $\cdot$ ); b – microplacas da análise da propriedade antioxidante pelo método de captação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS $\cdot$ ); c – microplacas da análise da propriedade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).

### 3.7 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. A análise tem caráter qualitativa, com objetivo de identificar grupos fitoquímicos presentes nos extratos e frações por meio da leitura sob coloração e fluorescência (Wagner; Bladt, 1996).

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 UV254 (Whatman®). Extratos e frações da folha da *A. tucumanensis* foram solubilizados em metanol (1:1). Cada placa recebeu 3 amostras (FIGURA 12), que foram aplicadas cuidadosamente na marcação estabelecida com o auxílio de capilares.

FIGURA 12 - CROMATOPLACAS DE SÍLICA GEL PARA ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA



FONTE: A autora (2024).

Para cada metabólito investigado foi utilizada uma fase móvel e um revelador, conforme o QUADRO 1. Foram investigados alcaloides, antraquinonas, esteroides, cumarinas, flavonoides, polifenóis, taninos e saponinas.

QUADRO 1 - METODOLOGIAS USADAS PARA INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Metabólito	Fase móvel	Revelador	Resultado	Referência
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5), universo amônico	Dragendorff	Presença de banda coloração alaranjado forte.	Valente <i>et al.</i> , (2006)
Antraquinonas	Hexano:acetato de etila:ácido fórmico (6:6:0,3)	Dimetilamina	Presença de banda rósea ou avermelhada.	Wagner; Bladt (1996)
Esteroides	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 1% e calor	Presença de banda azul ou violácea após aquecimento em estufa.	Wagner; Bladt (1996)
Cumarinas	Tolueno:acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e hidróxido de sódio a 1 N	Presença de banda azul fluorescente sob luz ultravioleta, que se intensifica com a adição de hidróxido de sódio.	Miguel (2003)
Flavonoides	Acetato de etila:acetona:água (15:8:2)	Reativo de NEU	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente sob luz ultravioleta.	Wagner; Bladt (1996)
Polifenóis/Taninos	Acetato de etila:acetona:água (15:8:2)	Cloreto férrico 5%	Presença de banda azul para taninos condensados. Presença de banda azul para taninos hidrolisáveis. Presença de banda castanha escura e preta para compostos fenólicos.	Wagner; Bladt (1996)
Saponinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Vanilina sulfúrica 1% e calor	Presença de banda azul, violeta ou amarela escura.	Wagner; Bladt (1996)

Nota: Reativo de NEU - difenilboriloxietilamina 1% em metanol e polietilenoglicol 4000 5% em etanol.

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS

A fração hexano e o extrato etanólico da folha da *A.tucumanensis* foram submetidos à técnica de cromatografia em coluna de sílica gel (FIGURA 7a). A escolha dessas amostras se deu com base no rendimento.

### 3.8.1 Cromatografia da fração hexano da folha (FHF)

Inicialmente foi preparada a pastilha contendo 5,8 g de amostra solubilizada em clorofórmio e incorporada a 18g de sílica-gel (60, 0,063 – 0,200 mm, Merck®, Alemanha). O gradiente de polaridade da fase móvel iniciou com 100% de hexano seguido da mistura com acetato de etila, em uma escala de 5%. A proporção de acetato de etila foi aumentada gradativamente até atingir 100%. Em seguida a fase móvel passou a ser composta pelo acetato de etila e metanol, também em escala de 5%, até acetato de etila:metanol (70:30, v/v). O volume de cada proporção da fase móvel foi de 100 mL. As amostras foram coletadas em frascos de vidro com capacidade de 10 mL e deixadas em temperatura ambiente até evaporação completa do solvente (FIGURA 7b).

FIGURA 7 - COLUNA DE SÍLICA GEL DA FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – coluna de sílica gel; b – frascos de vidro contendo amostras coletadas.

### 3.8.2 Isolamento do extrato etanólico da folha (EEF)

A pastilha do extrato etanólico foi elaborada com a solubilização de 4,6g de amostra em metanol e, em seguida, incorporada a 18g de sílica-gel (60, 0,063 – 0,200 mm, Merck®, Alemanha). Para esse extrato, o gradiente de polaridade da fase móvel iniciou com uma mistura de acetato de etila:hexano (80:20, v/v) até 100% de acetato de etila, em uma escala de 10%. Em seguida, a fase móvel foi composta por acetato de etila e metanol até que o volume fosse 100% de metanol e, por fim, metanol e água até a proporção 50:50 (v/v). O volume de cada proporção da fase móvel foi de 100 mL. As amostras foram coletadas em frascos de vidro, com capacidade

de 10 mL, e deixadas em temperatura ambiente até evaporação completa do solvente para a visualização de precipitados. Para evitar a formação de fungos, as amostras extraídas com metanol e água foram submetidas a secagem sob uma manta aquecida a 30°C.

### 3.8.3 Identificação dos compostos

As substâncias isoladas foram encaminhadas para análise espectrométrica com objetivo de identificar a sua estrutura. Foi utilizado aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker® (Alemanha), modelo DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente.

Após a análise das amostras encaminhadas ao RMN foi identificada a necessidade de otimizar a separação de compostos do extrato etanólico da folha, previamente submetido à coluna de sílica-gel. Dessa forma, parte da amostra foi solubilizada em metanol (FIGURA 8a) e submetida a coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com a fase estacionária Sephadex® LH-20 (Amersham Pharmacia, G&E) (FIGURA 8b). Foram utilizados 100 mL de metanol como eluente e as amostras coletadas em frascos de vidro com capacidade de 10 mL (FIGURA 8c), as quais foram deixadas em temperatura ambiente até completa secagem para posterior encaminhamento à leitura por RMN.

FIGURA 84 - ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM COLUNA SEPHADEX



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – solubilização do extrato etanólico da folha em metanol com auxílio de banho ultrassônico; b – coluna Sephadex®; c- frascos de vidro contendo amostras coletadas.

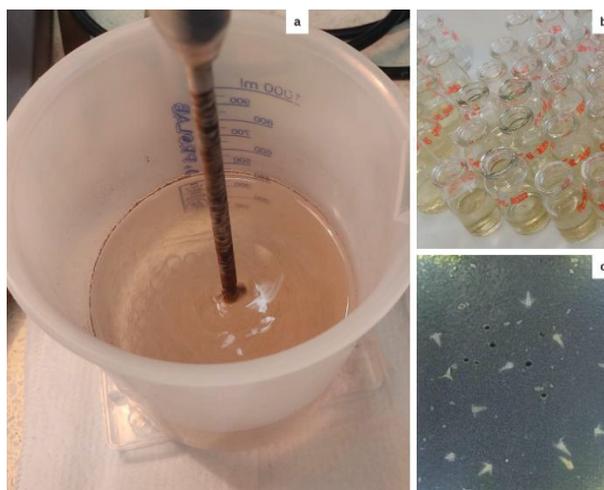
### 3.9 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* Leach

A toxicidade preliminar frente à *Artemia salina* Leach foi realizada segundo a metodologia de Meyer *et al.* (1982). Para a eclosão, os ovos de *A. salina* foram adicionados a uma solução salina (200mg/400mL) com temperatura entre 27 e 30°C, pH na faixa de 8 a 9 e mantidos sob aeração contínua e luminosidade por 48 horas (FIGURA 9a).

O preparo das diferentes concentrações (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) dos extratos e frações foi realizado a partir de uma solução estoque (SE) que consistiu em solubilizar 25 mg do extrato em 0,25 mL de DMSO, completando com água salina até 25 mL em balão volumétrico. Para controle negativo foi utilizada solução de DMSO 1% em água salina e, o controle positivo foi constituído pelo sulfato de quinidina nas mesmas concentrações da amostra. O teste foi realizado em quadruplicata.

Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *A. salina* foram transferidos para frascos de vidro contendo 5 mL da amostra. Os frascos foram mantidos abertos, em local limpo e temperatura ambiente por 24 horas (FIGURA 9b). Após esse período foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos (FIGURA 9c). Os resultados foram expressos em concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>), considerando tóxicos os extratos que apresentaram CL<sub>50</sub> inferior a 1000 µg/mL (Meyer *et al.*, 1982).

FIGURA 95 - ETAPAS DO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* Leach



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – processo de eclosão dos ovos da *A. salina*; b – frascos de vidros identificados contendo solução das amostras previamente solubilizadas e náuplios de *A. salina*; c – aplicação da solução em placas para contagem do náuplios de *A. salina* vivos e mortos após incubação por 24 horas.

### 3.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica foi realizada com base na metodologia de Aslam *et al.* (2012) e as etapas do ensaio estão descritas nas subseções a seguir.

#### 3.10.1 Preparo do sangue

A solução de hemácias foi obtida do sangue de carneiro desfibrilado da marca Newprov®, lote 62469 (FIGURA 16a). O frasco contendo o sangue foi homogeneizado manual e lentamente, em seguida foi transferida uma alíquota de 3 mL (FIGURA 10b) para um tubo Falcon previamente pesado em balança analítica e submetido a centrifugação a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta Pasteur e foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato-alcálico (PBS) gelada (4°C) em pH 7,4 para lavar o sangue, que foi novamente levado à centrifugação (Hermle®, Z323K, Alemanha) (FIGURA 10c). Essa etapa foi repetida três vezes até que se obtivesse um sobrenadante límpido. O volume final da hemácia foi diluído em solução PBS a 4°C, considerando a proporção de 100 mL de PBS para cada 5 gramas de hemácia, e mantida em banho de gelo durante todo o ensaio (FIGURA 10d).

O preparo da solução PBS supracitada foi realizado no dia anterior ao início das análises para que estivesse gelada no momento do uso. Consistiu na mistura de NaCl 58,44 g/mol, KCl 74,5513 g/mol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 141,96 g/mol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 136,086 g/mol e água destilada. O pH foi aferido com auxílio de fita medidora Merck®.

FIGURA 106 - PREPARO DO SANGUE DE CARNEIRO PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – sangue de carneiro desfibrilado Newprov®; b – frasco do sangue de carneiro homogeneizado para preparo da solução de hemácias; c – centrífuga Hermle®; d – solução de hemácias e solução tampão fosfato-alcálico (PBS).

### 3.10.2 Preparo da amostra e controles

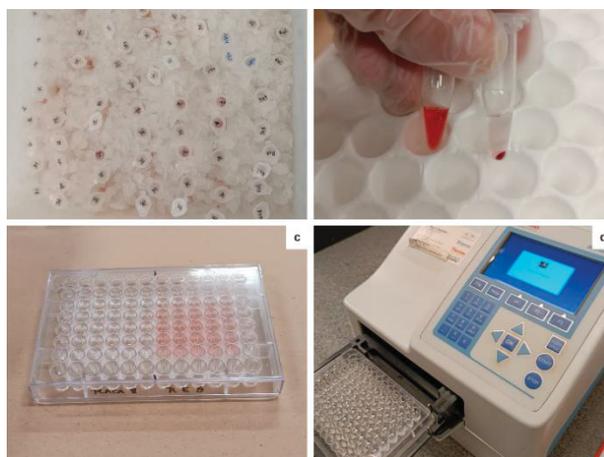
A solução estoque (SE) dos extratos, frações e controles foi preparada na concentração de 1 mg/mL, solubilizadas em solução de PBS contendo 5% de metanol. A partir da SE, que representou a concentração 1000 µg/mL, foram obtidas as outras 5 concentrações: 75, 100, 250, 500, 750 µg/mL, todas diluídas em solução PBS. Assim como para as amostras, foram preparadas concentrações de rutina e saponina como padrões fitoquímicos para comparação dos resultados. O triton 0,1% foi utilizado como controle positivo e, como controle negativo, soluções de PBS e metanol 5%.

### 3.10.3 Realização do teste

Aos microtubos de centrifugação tipo Eppendorf®, previamente identificados e com capacidade de 1,5 mL, foram adicionados 20 µL da amostra ou controles e 180 µL da solução de hemácia (2,5%), e então acondicionados com a tampa aberta em estufa a 37°C por 30 minutos. Após incubação, os microtubos foram submetidos ao banho de gelo por 5 minutos (FIGURA 17a) e então centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante (100 µL) do centrifugado foi diluído em 900 µL de PBS em um novo microtubo (FIGURA 17b), então 200 µL dessa solução foram transferidos para microplaca de 96 poços e fundo chato (FIGURA 17c). A microplaca continha a quintuplicata das amostras e dos controles e um branco de cada amostra (FIGURA 18), constituído por 20 µL da amostra e 180 µL de PBS. A leitura das absorbâncias foi realizada a 576 nm (Multiskan™ Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Osaka, Japão) (FIGURA 17d). O teste foi realizado em quintuplicata e os resultados expressos em % hemólise após aplicação da equação (4).

FIGURA 17 - ETAPAS DO ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – microtubos em banho de gelo; b – primeiro microtubo representando amostra que sofreu hemólise e o segundo microtubo representado amostra que não sofreu hemólise; c – microplaca de 96 poços de fundo chato contendo as soluções das amostras analisadas; d – leitor de microplaca.

FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NA MICROPLACA PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. Tucumanensis*

	Amostra 1						Amostra 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL Branco	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL Branco
B	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL Branco	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL Branco
C	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL Branco	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL Branco
D	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL Branco	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL Branco
E	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL Branco	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL	750 µL Branco
F	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL Branco	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL Branco
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

NOTA: amostra 1 e amostra 2 representam extratos ou frações distintas distribuídas na microplaca.

$$Hemólise (\%) = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{branco}}{\text{absorbância do Triton} - \text{branco}} \times 100 \quad (4)$$

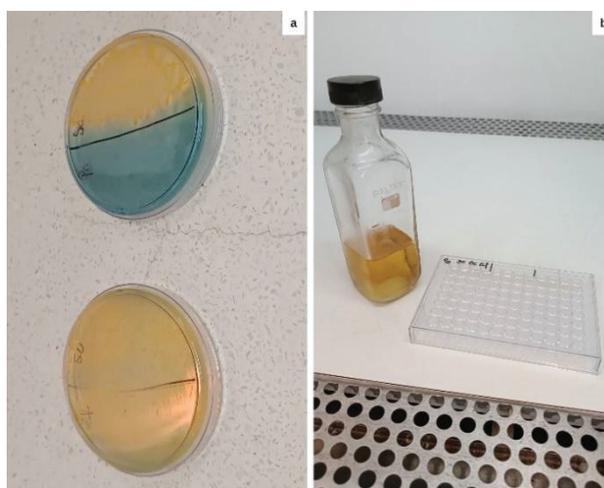
### 3.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi testada com as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (FIGURA 19a). Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Cockerill *et al.*, 2012).

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U”. Foram preparadas soluções estoque dos extratos na concentração de 20 mg/mL, diluídos em metanol. Os inóculos de *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram preparados em solução salina 0,85% a partir de uma cultura de placa durante a noite com uma turbidez equivalente à escala McFarland 0,5 ( $\sim 1,0 \times 10^8$  UFC/mL). Esta suspensão foi então diluída 1:20 ( $\sim 5 \times 10^5$  UFC/mL).

Os extratos foram diluídos em série (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8  $\mu\text{g/mL}$ ) em caldo Mueller Hinton II (FIGURA 19b) para um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foi adicionada em cada poço.

FIGURA 19 - ENSAIO ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



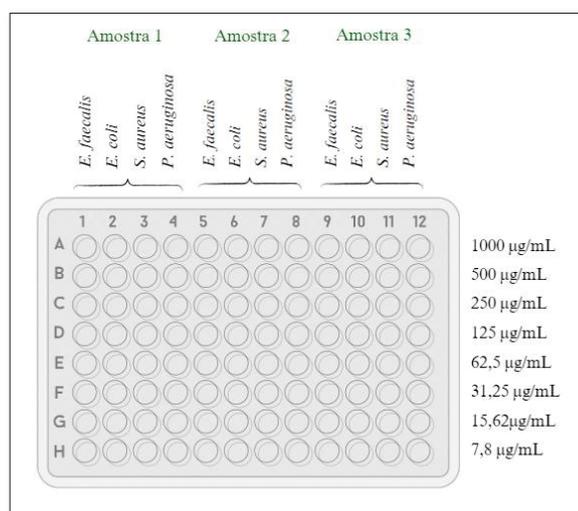
FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – inóculos de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); b – solução Muller Hinton II e microplaca de 96 poços para análise da atividade antimicrobiana.

Como controle positivo, o antibiótico gentamicina (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,390; 0,195; 0,097; 0,04; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado aos poços. Como controle negativo, os microrganismos foram tratados com 1% de metanol. As placas foram incubadas por 24 h a

35 ± 1°C. A FIGURA exemplifica como foi realizada a distribuição das amostras nas microplacas.

FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA *A. Tucumanensis* PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA



FONTE: A autora (2024).

NOTA: amostra 1, amostra 2 e amostra 3 representam a distribuição de 3 diferentes amostras (extratos ou frações) na microplaca; *E. faecalis* - *Enterococcus faecalis*; *E. coli* - *Escherichia coli*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*.

Para a determinação da CIM, foi considerada a concentração do extrato que causou a inibição total do crescimento bacteriano quando observada ausência de turbidez na placa a olho nu, e expresso em microgramas por mililitro (µg/mL). A atividade antibacteriana dos extratos foi classificada com base na concentração inibitória mínima (CIM): CIM < 100 µg/mL, 100 a 500 µg/mL, 500 a 1000 µg/mL, e > 1000 µg/mL, sendo respectivamente considerados bom, moderado, fraco e inativo (Pessini *et al.*, 2003). A análise foi realizada em duplicata.

### 3.12 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os processos que envolveram extração e identificação de polissacarídeos foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

### 3.12.1 Material vegetal

Foi utilizado o resíduo seco da folha da *A. tucumanensis*, após ter passado por extrações com acetona e etanol para as análises fitoquímicas (item 2.6). Dessa forma foram removidos lipídios, pigmentos e outros compostos hidrofóbicos.

### 3.12.2 Extração

Os polissacarídeos foram primeiramente extraídos sob refluxo acoplado ao banho-maria a 100°C. Foram utilizados 2 balões para a extração aquosa, cada um com 75 g de amostra e aproximadamente 1 litro água destilada. Os balões foram submetidos à extração por 2 horas (FIGURA a). Após o resfriamento, o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 8000 rpm em centrífuga (Hermle® Z446, Alemanha). O sobrenadante foi retirado e filtrado com auxílio de peneira com uma fina camada de algodão para obtenção de um extrato límpido e sem resíduos (FIGURA b). O precipitado voltou ao balão para uma nova extração e essa etapa foi repetida mais 4 vezes.

O extrato aquoso obtido foi submetido à diálise aberta por 48 horas utilizando membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa (Spectra-Por®) (FIGURA c). Após a diálise, o extrato foi acondicionado em recipientes plásticos identificados, congelados e liofilizados (FIGURA d). À essa fração deu-se o nome de ATFW.

FIGURA 21 - ETAPAS DO PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

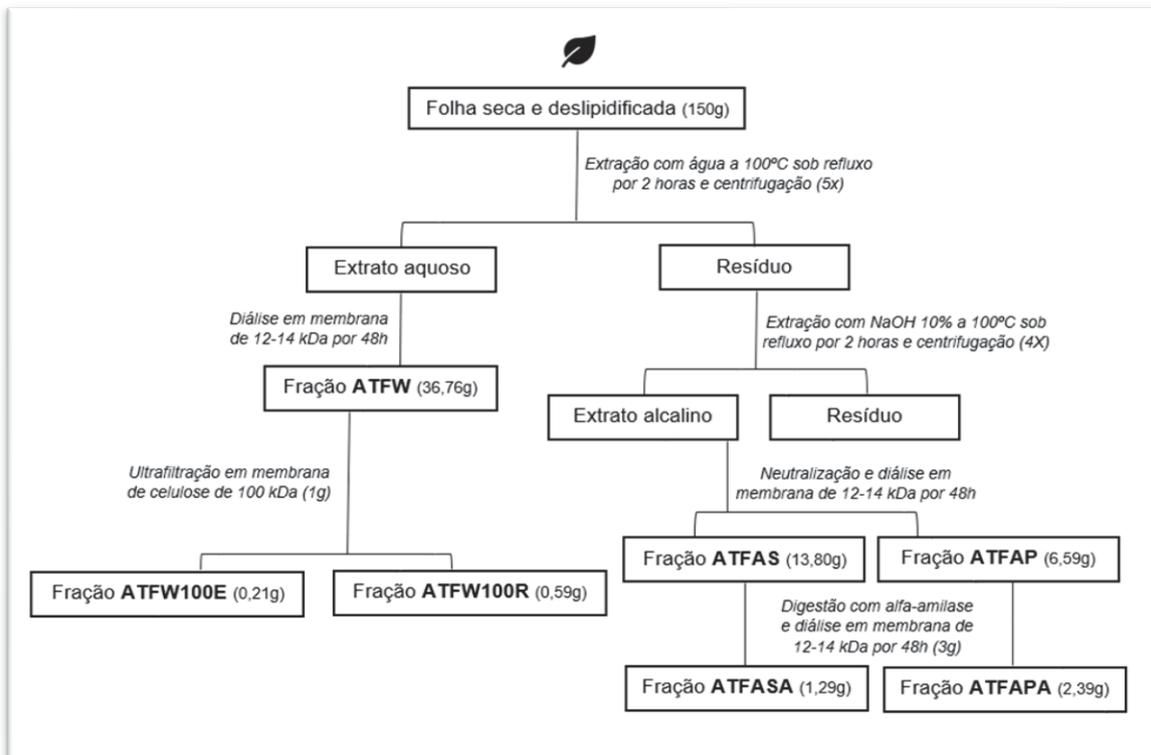
NOTA: a – extração dos polissacarídeos com água sob refluxo acoplado ao banho-maria; b – extrato aquoso filtrado; c – diálise aberta do extrato aquoso; d – extrato aquoso liofilizado.

Finalizada a extração aquosa, o resíduo foi extraído com solução de NaOH a 10%, para extração das hemiceluloses. As etapas da extração, centrifugação, filtragem, diálise e liofilização seguiram as mesmas metodologias da extração aquosa descritas anteriormente. Porém, antes da diálise o extrato alcalino foi neutralizado com adição de ácido acético. A extração alcalina foi repetida 4 vezes. Cabe destacar que mesmo dialisado o extrato apresentou um precipitado e por isso ele foi novamente centrifugado, originando as frações sobrenadante (ATFAS) e precipitado (ATFAP), que foram analisadas separadamente.

### 3.12.3 Purificação

Os polissacarídeos obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas foram submetidos a diversos processos de purificação, conforme descritos a seguir. A FIGURA 11 apresenta o fluxograma da obtenção dos extratos e respectivas frações.

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES PARA ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DA FOLHA DA *A. Tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: ATFW – extrato aquoso das folhas da *A.tucumanensis*; ATFW100E – fração eluída do extrato aquoso das folhas da *A.tucumanensis* após ultrafiltração; ATFW100R – fração retida do extrato aquoso das folhas da *A.tucumanensis* após ultrafiltração; ATFAS – fração sobrenadante do extrato alcalino das folhas da *A.tucumanensis*; ATFAP – fração precipitada do extrato alcalino das folhas da *A.tucumanensis*; ATFASA – fração sobrenadante do extrato alcalino das folhas da *A.tucumanensis* hidrolisada com amilase; ATFAPA – fração precipitada do extrato alcalino das folhas da *A.tucumanensis* hidrolisada com amilase; kDa – quilodalton.

### 3.12.3.1 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração

Os polissacarídeos da fração ATFW foram purificados pelo método de ultrafiltração. Aproximadamente 1g da amostra foi diluída em 150 mL de água destilada sob agitação por 20 horas e ultrafiltrada sob pressão em um sistema de filtração modelo 16249 (Sartorius®), acoplado a um cilindro de ar comprimido (FIGURA a). Foi utilizada membrana de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro (Millipore®) e com limite de exclusão de 100 kDa (FIGURA b). Esse processo ocorreu por 48 horas e foram obtidas duas frações: fração eluída (ATFW100E) e fração retida (ATFW100R). Ambas foram congeladas e liofilizadas.

FIGURA 23 - PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a - sistema de filtração acoplado a um cilindro de ar comprimido; b – membrana de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro (Millipore®) e com limite de exclusão de 100 kDa.

### 3.12.3.2 Fracionamento dos polissacarídeos por processo enzimático

Esse método foi aplicado às frações alcalinas ATFAS e ATFAP. Três gramas de cada amostra foram diluídas em 100 mL de água destilada e receberam 500  $\mu$ L e 1000  $\mu$ L respectivamente da enzima alfa-amilase (Sigma®). As frações ficaram sob agitação à temperatura de 60 °C por 20 horas para adequada diluição e digestão do amido. O pH neutro foi confirmado com o uso da fita medidora e as frações foram submetidas a 48 horas de diálise aberta utilizando membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa (Spectra-Por®). As frações foram liofilizadas e denominadas ATFASA e ATFAPA.

### 3.12.4 Análise estrutural dos polissacarídeos obtidos

#### 3.12.4.1 Composição monossacarídica

A análise foi iniciada pela hidrólise de 3 mg de cada amostra em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 1M. O vial contendo essa solução foi levado à estufa a 100 °C por 16 horas e então a solução foi transferida para uma placa de petri para evaporação do ácido. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de água destilada e os monossacarídeos presentes foram convertidos em alditol por redução, utilizando NaBH<sub>4</sub> (boroidreto de sódio) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

A etapa seguinte consistiu na acetilação com uma mistura de piridina-anidrido acético (1:1 v/v – 0,5 ml de cada) submetido a aquecimento em estufa a 100 °C por 30 minutos (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). As reações foram interrompidas com adição de 1 mL de água destilada. Foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 2 mL de sulfato de cobre 5% para a eliminação da piridina residual. O sobrenadante foi pipetado e descartado, e o precipitado lavado com água destilada até que a amostra apresentasse coloração azul clara. Retirada toda a água, a fase clorofórmica foi desidratada com adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (sulfato de sódio) anidro, filtrada com algodão e submetida a secagem em temperatura ambiente para evaporação do clorofórmio.

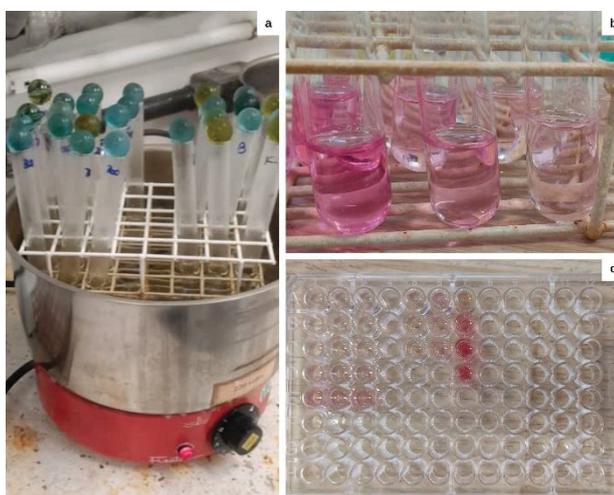
Os acetatos de alditol resultantes foram analisados por GC-MS usando cromatógrafo gasoso Varian® acoplado a um espectrômetro de massa, modelo Saturn® 2000R, com He como gás de arraste. Os monossacarídeos foram identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

#### 3.12.4.2 Dosagem de ácidos urônicos

O teor de ácido urônico foi determinado por espectrofotometria (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991). Após dissolvida em solução de NaOH 0,5%, foram adicionados aos tubos de ensaio 400 µL da amostra, 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico, 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os tubos foram agitados em vórtex e levados tampados ao banho-maria com água fervente por 20 minutos (FIGURA 24a), em seguida resfriados em temperatura ambiente.

Após o resfriamento foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de metahidroxibifenila (0,15%, p/v, em NaOH 0,5%, p/v), exceto no tubo que representou o branco da amostra o qual recebeu 80  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5% para completar o volume (FIGURA 24b). Foram transferidos 200  $\mu\text{L}$  da solução de cada tubo para microplaca de 96 poços e realizada a leitura da absorbância a 525 nm (FIGURA 24c). A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de coloração rósea. Como padrão foi utilizado o ácido galacturônico para as frações ATFW, ATFW100R e ATFW100E, e o ácido glucurônico para as frações ATFAS, ATFAP, ATFASA, ATFAPA (APÊNDICE 3).

FIGURA 24 - ETAPAS DA ANÁLISE DE ÁCIDOS URÔNICOS DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a – tubos de ensaio contendo soluções das amostras em banho-maria; b – curva padrão de ácido galacturônico; c – microplaca contendo curva padrão de ácido galacturônico e soluções das amostras.

### 3.12.5 Teste de homogeneidade

As análises de homogeneidade foram realizadas em aparelho Wyatt Technology equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC), contendo quatro colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão de 7.106, 4.105, 8.104 e 5.103 Da, um detector de índice de refração modelo Waters 2410, e um detector de espalhamento de laser multiângulo (MALLS) a 632,8 nm modelo Dawn DSP. Uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 mol/L contendo  $\text{NaN}_3$  0,2 g/L foi utilizada como eluente, com fluxo controlado de 0,6 mL/min.

O preparo das amostras consistiu na solubilização em eluente, na concentração de 1 mg/mL, e filtradas para um vial com auxílio de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Os resultados foram analisados com o software ASTRA 4.70.07.

### 3.12.6 Identificação dos polissacarídeos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras previamente liofilizadas foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  ou DMSO- $d_6$  e em seguida transferidas para tubos de 5 mm de diâmetro. As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-DRX400 MHz, sonda invertida de 5 mm de diâmetro nas temperaturas de 50 °C ou 70 °C, operando a 9,5 T, observando  $^{13}\text{C}$  a 100,61 MHz e  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz. A calibração dos espectros foi realizada tendo como referências internas a acetona ( $\delta\text{C}$  30,2/  $\delta\text{H}$  2,22 ppm para  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) ou DMSO- $d_6$  ( $\delta\text{C}$  39,7/  $\delta\text{H}$  2,60 ppm). Foram realizadas análises de RMN $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 e experimentos de RMN-2D (HSQC).

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do perfil físico-químico foram apresentados de modo descritivo, contendo resultado das médias e desvio padrão das replicatas. Essa análise foi realizada com auxílio do Excel®.

Para os doseamentos e atividade antioxidante os testes de normalidade, homogeneidade e significância foram avaliados pelo programa estatístico Action® versão 2.8. Foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) para as amostras normais e homogêneas. O teste Tukey foi aplicado às amostras em que  $p < 0,05$  e, para analisar a diferença entre as médias, foi aplicado o teste T. Os dois últimos testes foram realizados pelo software SAMS-Agri versão 8.2.

A concentração letal para 50% dos náuplios ( $\text{CL}_{50}$ ) foi determinada pela aplicação do teste Probit com o uso do programa IBM SPSS Statistics 22, considerando tóxicos os extratos que apresentaram  $\text{CL}_{50}$  inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

A atividade hemolítica foi analisada pelo programa estatístico SISVAR 5.8 mediante aplicação do teste ANOVA, e a diferença estatística determinada por Tukey ( $p < 0,05$ ) (Ferreira, 2011).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

A exsicata do material botânico foi identificada pelo Engenheiro Florestal do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Marcelo Leandro Brotto, onde encontra-se registrada sob o número 386620 (ANEXO 2).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados encontrados nas análises físico-químicas da folha e do caule da espécie vegetal *A. tucumanensis* estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 - PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *A.tucumanensis*

AMOSTRA	FOLHA	CAULE
UMIDADE MATERIAL FRESCO (%)	82,81 ± 0,10	76,34 ± 0,37
UMIDADE MATERIAL SECO (%)	10,58 ± 0,28	12,21 ± 0,10
CINZAS (%)	10,11 ± 0,24	7,76 ± 0,12
pH	6,35 ± 0,17	6,52 ± 0,02
ACIDEZ TITULÁVEL (%)	11,83 ± 2,05	7,12 ± 1,15
PROTEÍNA (%)	8,25 ± 0,02	6,87 ± 0,03
LIPÍDIO (%)	5,76 ± 0,97	4,03 ± 1,38
FIBRA TOTAL (%)	6,53 ± 0,97	7,46 ± 0,81

FONTE: A autora (2024).

Nota: Valores expressos em média ± desvio padrão das replicatas.

A umidade é uma das determinações mais importantes na análise de alimentos, uma vez que está relacionada à estabilidade, à composição e ao tempo de deterioração dos mesmos (Ribeiro, 2007). Conforme esperado em detrimento da textura de cada parte da planta, a folha de característica carnuda apresentou um teor de umidade maior (82,81%) em relação ao caule (76,34%). O mesmo foi observado quanto ao teor de cinzas, indicando maior teor de matéria inorgânica nas folhas (10,11%) quando comparado ao teor do caule (7,76%).

O teor de umidade encontrado por Viana *et al.* (2015) foi semelhante para a folha da *Basella rubra* (83,19%), espécie pertencente à família Basellaceae. Por outro lado, o teor de cinzas foi menor (4,33%). Os minerais predominantes nas folhas secas da *Basella rubra* nesse

estudo foram potássio (19,5 mg/g), cálcio (10,5 mg/g), ferro (112,5 mg/g), zinco (10,4 mg/g) e boro (33,1 mg/g) (Viana *et al.*, 2015). As folhas da mesma espécie apresentaram mais de 15% de cinzas em sua composição (Tongco; Añis; Tamayo, 2015), evidenciando uma variação importante entre elas.

Na análise do pH é determinada a concentração de íons de hidrogênio das amostras, um importante parâmetro para avaliar o estado de conservação e armazenamento de alimentos. Vegetais com pH mais próximos ao alcalino tendem ao menor tempo de cocção (Macedo; Matos, 2015). Folhas e caule da *A. tucumanensis* tiveram baixa acidez, resultado que associado ao alto teor de umidade supracitado indica maior susceptibilidade dessas amostras à deterioração. O pH encontrado próximo da faixa de neutralidade foi semelhante ao das folhas da *Basella rubra* (Viana *et al.*, 2015).

Apesar de lipídios não serem macronutrientes predominantes em folhas, esse estudo apresentou teor maior na *A. tucumanensis* (5,76%) ao comparado com 1,58% da *Basella alba* (Tongco; Añis; Tamayo, 2015) e 1,37% da *Basella rubra* (Viana *et al.*, 2015).

Da mesma forma que os lipídios, não se esperam proporções significativas de proteínas em hortaliças. As folhas da *A. tucumanensis* apresentaram mais de 8% desse nutriente em sua composição, enquanto o caule, 6,87%. A busca por alternativas mais sustentáveis de alimentos tem conferido atenção às fontes vegetais de proteínas. Nesse sentido, as PANC parecem ser aliadas promissoras. Folhas, caules, sementes e estudadas previamente chegam a apresentar 20 a 37% de proteína, dependendo da espécie (Milião *et al.*, 2022). Além de suprir parte das necessidades proteicas na alimentação, o uso das fontes alternativas via PANC contribui para a redução do impacto ambiental e econômico envolvidos na criação de animais, e contribui para o uso de partes de plantas que comumente são descartadas pelo consumidor e pela indústria.

As fibras totais da folha e do caule da *A. tucumanensis* (6,53% e 7,46%, respectivamente) foram semelhantes aos encontrados nas folhas da *Basella alba*, 7,23% (Tongco; Añis; Tamayo, 2015). Em relação às fibras alimentares, convém relatar que o interesse em agregar à essa tese uma investigação da caracterização dos polissacarídeos foi despertado durante os experimentos físico-químicos. Ao processar as folhas *in natura* para a condução de algumas análises, foi observada a formação de uma espuma viscosa (FIGURA 25), característica da presença de fibras solúveis.

FIGURA 25 - FOLHA FRESCA DA *A.tucumanensis* APÓS TRITURAÇÃO

FONTE: A autora (2024).

#### 4.3 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O extrato cetônico da folha (ECF) e o extrato cetônico do caule (ECC) partiram de 332,17 g e 314,96 g de material seco, respectivamente. O ECF apresentou rendimento de 4,15%, enquanto o ECC rendeu 11,02%. Sendo assim, é necessário 1 kg de folha e de caule da *A. tucumanensis* para a obtenção de 41,50 g e 110,02 g de extrato cetônico das respectivas partes. Após a evaporação da acetona dos resíduos de folha e caule, foi realizada a extração com etanol, dando origem ao EEF que rendeu 6,64% e, ao EEC com rendimento de 23,93%.

O rendimento das frações, obtidas pelo fracionamento do ECF e ECC e calculado a partir da massa total dos extratos cetônicos, está representado na

TABELA 2.

TABELA 2 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO EXTRATO CETÔNICO DA FOLHA E DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL *A.tucumanensis*

AMOSTRA	MASSA TOTAL E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS			
	FOLHA		CAULE	
	MASSA TOTAL (g)	RENDIMENTO (%)	MASSA TOTAL (g)	RENDIMENTO (%)
EXTRATO CETÔNICO	13,7	-	15,3	-
HEXANO	10,1	73,2	3,5	22,8
CLOROFÓRMIO	1,6	11,6	1,2	11,6
ACETATO DE ETILA	0,1	0,7	1,5	9,8
REMANESCENTE	1,2	8,7	0,4	2,6

FONTE: A autora (2024).

No estudo de Adegoke e Ojo (2017) o extrato metanólico da folha de *Basella alba L.* apresentou rendimento de 24,30%, enquanto o caule apresentou rendimento de 13,10%. Na mesma pesquisa, o cultivar denominado *Basella rubra* apresentou rendimento de folha e caule de 19,43% e 12,24%, respectivamente.

Como a extração bruta do presente estudo foi realizada com acetona, um rendimento menor ao comparado com etanol e metanol era esperado. O solvente extrator foi definido devido à dificuldade de trabalhar com a viscosidade do extrato hidroalcolico. Tshikalange, Meyer e Hussein (2005) relataram a mesma dificuldade ao estudarem a *A. cordifolia*, havendo a necessidade de centrifugar o extrato aquoso para captação do sobrenadante.

#### 4.4 DOSEAMENTOS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

O doseamento de compostos fenólicos, de flavonoides totais e a propriedade antioxidante dos extratos e frações da folha e do caule estão apresentados nas TABELA 3 e 4, respectivamente.

TABELA 3 - DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS, DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*

AMOSTRA	TPC (mg GAE/100mg extrato)	TFC (mg CE/100mg extrato)	ABTS* (µmol ET/100mg extrato)	DPPH* (µmol ET/100mg extrato)	FRAP (µmol ET /100mg extrato)
ECF	0,67±0,04 <sup>f</sup>	0,62±0,03 <sup>c</sup>	4,40±0,09 <sup>d</sup>	0,99±0,07 <sup>d</sup>	3,49±0,02 <sup>e</sup>
FHF	1,05±0,06 <sup>e</sup>	0,55±0,04 <sup>c</sup>	NA	NA	2,48±0,03 <sup>f</sup>
FCF	2,63±0,08 <sup>a</sup>	0,89±0,20 <sup>b</sup>	11,85±0,42 <sup>a</sup>	6,99±0,20 <sup>a</sup>	14,82±0,16 <sup>a</sup>
FAF	1,49±0,06 <sup>e</sup>	0,22±0,02 <sup>d</sup>	8,60±0,26 <sup>b</sup>	3,68±0,18 <sup>b</sup>	10,59±0,10 <sup>b</sup>
FRF	1,25±0,11 <sup>d</sup>	1,22±0,09 <sup>a</sup>	4,82±0,20 <sup>d</sup>	2,29±0,08 <sup>c</sup>	3,98±0,09 <sup>d</sup>
EEF	1,97±0,16 <sup>b</sup>	0,71±0,11 <sup>bc</sup>	7,30±0,07 <sup>c</sup>	3,61±0,16 <sup>b</sup>	7,09±0,22 <sup>c</sup>

FONTE: A autora (2024).

Nota: ECF = extrato cetônico folha; FHF = fração hexano folha; FCH = fração clorofórmio folha; FAF = fração acetato de etila folha; FRF = fração remanescente folha; EEF = extrato etanólico folha; TPC = total de fenólicos; GAE = equivalentes de ácido gálico; TFC = total de flavonoides; CE = equivalentes de catequina; ABTS\* = 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico; ET = equivalentes de Trolox; DPPH\* = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; FRAP = poder antioxidante de redução do ferro. NA = não apresentou atividade antioxidante. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

A fração clorofórmio da folha foi estatisticamente superior no teor de fenólicos totais quando comparada às demais amostras, seguida do extrato etanólico. Para o teor de flavonoides totais, a fração remanescente da folha foi a que se destacou. Nos três ensaios de propriedade antioxidante, a fração clorofórmio novamente apresentou melhores resultados. Tanto para o ensaio de DPPH\* como para ABTS\*, a fração hexano não demonstrou atividade antioxidante e,

apesar de ter sido apresentada atividade dessa fração no ensaio FRAP, cabe ressaltar que foi o menor teor entre as amostras estudadas (TABELA 3).

O ensaio de propriedade antioxidante frente ao radical DPPH consiste em sua redução pela doação de hidrogênios ou elétrons presentes na amostra, evidenciado pela mudança da coloração e absorbância. O DPPH<sup>•</sup> caracteriza-se por sua solubilidade em solventes orgânicos. O radical ABTS é solúvel tanto em solventes orgânicos como em água, e nesse ensaio se espera que antioxidantes da amostra promovam a redução do ABTS<sup>•</sup>. Quanto ao método FRAP é esperada a redução do complexo íon férrico-TPTZ na presença de antioxidantes e, quanto maior a absorbância maior a capacidade redutora (Prior; Wu; Schaich, 2005; Alam; Bristi; Rafiqzaman, 2013; Boroski *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos da *A. tucumanensis* foram superiores aos encontrados nas folhas da *Basella alba* por Adegoke e Ojo (2017). Os autores avaliaram o extrato metanólico da folha, que resultou 0,33 mg de equivalente ácido gálico em 100 mg de extrato. Por outro lado, os extratos etanólico e aquoso da folha da *Basella alba* apresentaram teor de compostos fenólicos superiores em estudo feito por Tongco, Añis e Tamayo (2015).

O teor de flavonoides encontrado na fração remanescente da folha da *A. tucumanensis* foi superior ao extrato bruto metanólico das folhas da *Basella alba* e da *Basella rubra* em estudo anterior, que foram de 0,93 mg e 0,63 mg de equivalente de catequina em 100 mg de extrato, respectivamente (Adegoke; Ojo, 2017). Os extratos etanólicos e aquoso da folha de *Basella alba* estudado por Tongco, Añis e Tamayo (2015) apresentaram valores superiores para flavonoides comparados com a *A. tucumanensis*, assim como ocorreu em relação ao teor de fenólicos totais.

O extrato metanólico das folhas da *Basella alba* obtido por agitação em temperatura ambiente foi testado em estudo de Sheik *et al.* (2023), que buscavam investigar a atividade antioxidante e antiproliferativa da espécie vegetal em células de câncer colorretal. Nessa pesquisa, o total de flavonoides do extrato foi mais que o dobro do total de fenólicos analisados, sendo o primeiro 118,1 µg de equivalente de quercetina por grama de extrato e, o segundo, 57,9 µg equivalente de ácido gálico por grama de extrato (Sheik *et al.*, 2023).

No ano de 2022 um grupo de pesquisadores japoneses associou o pó de folhas de *A. cordifolia* ao óleo da semente de uma espécie vegetal nativa da Ásia, chamada *Perilla frutescens*. O objetivo da intervenção duplo-cego, que durou 12 meses e envolveu 32 idosos saudáveis, foi verificar se a suplementação combinada dessas duas plantas seria capaz de otimizar a função cerebral. Nessa ocasião, o grupo suplementado com ambas as espécies apresentou maior pontuação de índice cognitivo, isso quando comparado ao grupo que recebeu

apenas o óleo da *Perilla frutescens*. A quantidade do pó de folha de *A. cordifolia* administrado continha, segundo os autores, 1,46 mg de vitexina e 1,12 mg de adenosina, e uma das justificativas para esses resultados foi o potencial antioxidante desses compostos frente à redução dos níveis de *N*-(épsilon)-carboximetil-lisina (CML), um produto final de glicação avançada e marcador bioquímico dos níveis de estresse oxidativo (Hashimoto *et al.*, 2022).

Tal qual observado nas folhas, a fração clorofórmio do caule da *A. tucumanensis* ganhou destaque no teor de fenólicos totais e nos ensaios ABTS•, FRAP, e a fração hexano não demonstrou atividade antioxidante nos experimentos ABTS• e DPPH•. Para o ensaio de redução do DPPH•, a fração acetato de etila foi estatisticamente superior às demais amostras, e o extrato etanólico se diferenciou quanto aos flavonoides totais (TABELA 4).

Dados que chamam a atenção referem-se à discrepância da fração clorofórmio do caule em comparação à folha para o teor de fenólicos totais, bem como para os três ensaios da propriedade antioxidante ( FIGURA 26). Todavia, esses achados sugerem a necessidade de conduzir futuramente o *screening* fitoquímico com extratos e frações do caule, para posterior isolamento e identificação dos compostos envolvidos nesse potencial biológico.

TABELA 4 - DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS, DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*

AMOSTRA	TPC (mg GAE/100mg extrato)	TFC (mg CE/100mg extrato)	ABTS• (µmol ET/100mg extrato)	DPPH• (µmol ET/100mg extrato)	FRAP (µmol ET /100mg extrato)
ECC	0,42±0,02 <sup>f</sup>	0,75±0,01 <sup>bc</sup>	1,01±0,09 <sup>d</sup>	NA	1,07±0,03 <sup>d</sup>
FHC	0,91±0,05 <sup>c</sup>	0,22±0,04 <sup>c</sup>	NA	NA	1,91±0,30 <sup>d</sup>
FCC	3,35±0,09 <sup>a</sup>	0,19±0,00 <sup>c</sup>	65,04±0,81 <sup>a</sup>	11,91±0,54 <sup>b</sup>	61,43±1,58 <sup>a</sup>
FAC	2,10±0,10 <sup>b</sup>	0,55±0,02 <sup>c</sup>	5,78±0,10 <sup>b</sup>	22,54±0,80 <sup>a</sup>	6,00±0,04 <sup>b</sup>
FRC	1,21±0,09 <sup>d</sup>	1,42±0,08 <sup>b</sup>	4,32±0,19 <sup>c</sup>	1,92±0,26 <sup>c</sup>	3,82±0,06 <sup>c</sup>
EEC	1,45±0,05 <sup>c</sup>	2,84±0,74 <sup>a</sup>	5,43±0,15 <sup>b</sup>	2,72±0,11 <sup>c</sup>	4,84±0,04 <sup>bc</sup>

FONTE: A autora (2024).

Nota: ECC = extrato cetônico caule; FHC = fração hexano caule; FCC = fração clorofórmio caule; FAC = fração acetato de etila caule; FRC = fração remanescente caule; EEC = extrato etanólico caule; TPC = total de fenólicos; GAE = equivalentes de ácido gálico; TFC = total de flavonoides; CE = equivalentes de catequina; ABTS• = 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico; ET = equivalentes de Trolox; DPPH• = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; FRAP = poder antioxidante de redução do ferro. NA = não apresentou atividade antioxidante. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

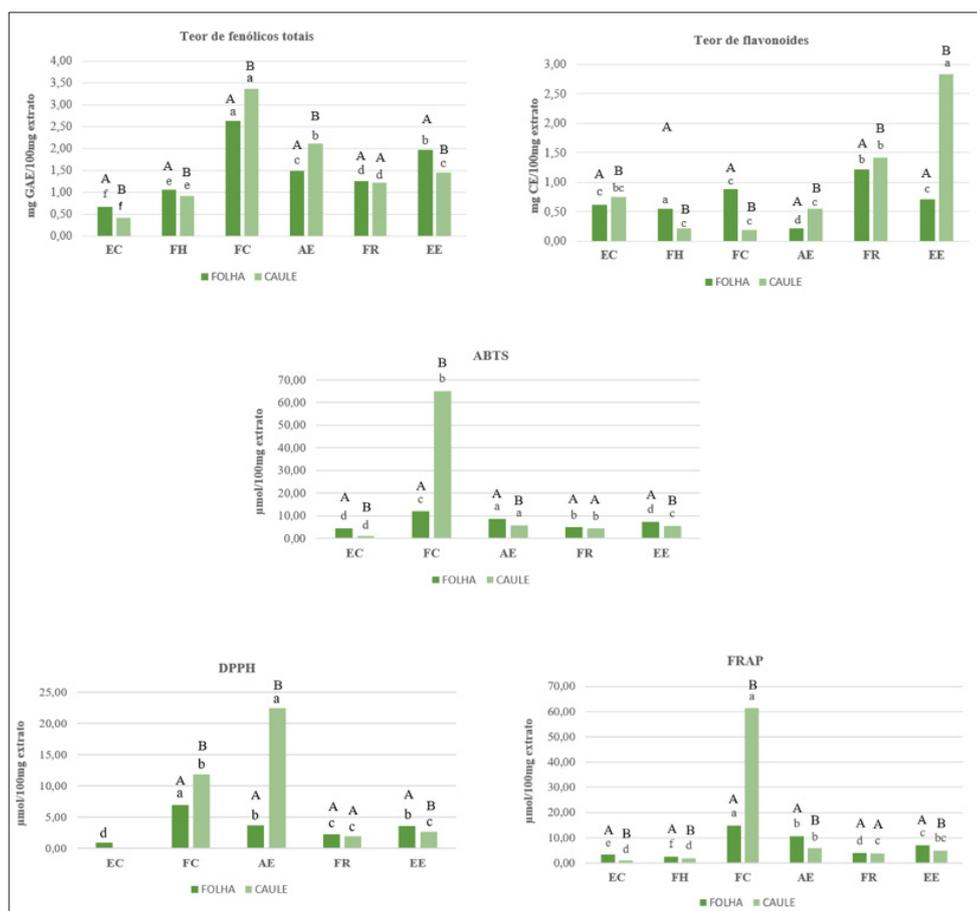
Quando comparados os extratos e frações da folha e do caule é possível notar que apenas a fração remanescente apresentou equivalência estatística para quase todos os ensaios, exceto para o teor de flavonoides. Neste, folha e caule foram significativamente diferentes segundo o teste T, assim como observado nas demais amostras e análises ( FIGURA 26).

A sazonalidade deve ser considerada quando o assunto é propriedade antioxidante e doseamento de compostos (Cechinel; Yunes, 1997). Um estudo buscou verificar a possível

interferência da estação do ano e do grau maturação das folhas de *A. cordifolia* nos resultados de fenólicos totais e propriedade antioxidante frente ao radical DPPH. O teor de fenólicos foi superior em folhas jovens coletadas no inverno, e a ação antioxidante foi melhor em todos os graus de maturação das amostras coletadas no outono e inverno (Alba; Tessaro; Sobottka, 2024).

Apesar da disponibilidade de estudos anteriores de atividade antioxidante, doseamentos de compostos fenólicos e flavonoides com espécies vegetais da mesma família ou gênero, há dificuldade de comparações em detrimento do solvente extrator utilizado, do método de extração e até mesmo da forma de apresentação dos resultados.

FIGURA 26 – COMPARAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS E DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA E CAULE DA *A. tucumanensis*



Fonte: A autora (2024).

NOTA: EC = extrato cetônico; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio; AE = fração acetato de etila; FR = fração remanescente; EE = extrato etanólico; ABTS\* = 3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico; DPPH\* = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; FRAP = poder antioxidante de redução do ferro; TPC = total de fenólicos; TFC = total de flavonoides; ET = equivalentes de Trolox. GAE = equivalentes de ácido gálico; CE = equivalentes de catequina; Letras minúsculas iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais não apresentam diferença estatística entre as médias das amostras pelo teste T.

#### 4.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A técnica da cromatografia em camada delgada (CCD) compreende um modo de cromatografia do tipo adsorção. Uma fase móvel revela o composto que se deseja separar da fase estacionária, que compreende as amostra estudadas (Collins, 2010). A Tabela 5 sintetiza os grupos de metabólitos secundários presentes na folha da *A. tucumanensis*, segundo ensaio de CCD.

TABELA 5 - RESULTADOS DA PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

AMOSTRA	ALCALOIDES	ANTRAQUINONAS	CUMARINAS	ESTEROIDES	FLAVONOIDES	POLIFENÓIS	SAPONINAS	TANINOS
ECF	-	-	-	+	+	+	-	+
FHF	-	+	-	+	-	-	+	-
FCF	-	-	-	-	+	+	+	+
FAF	-	-	-	-	+	-	-	-
FRF	-	-	-	-	-	-	-	-
EEF	-	-	-	-	+	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

Nota: ECF = extrato cetônico folha; FHF = fração hexano folha; FCH = fração clorofórmio folha; FAF = fração acetato de etila folha; FRF = fração remanescente folha; EEF = extrato etanólico folha; Símbolo (+) indicativo de reação positiva; Símbolo (-) indicativo de reação negativa.

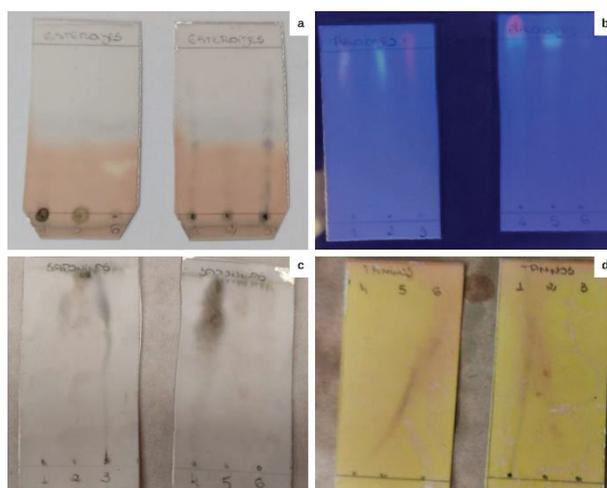
Foi possível observar a presença de antraquinonas na fração hexano evidenciada por uma banda verde escura, o que corrobora com o teor de fenólicos totais apresentados na TABELA 3. As bandas escuras identificadas no extrato cetônico e na fração hexano sugerem a presença de esteroides (FIGURA 27a). O extrato etanólico, as frações clorofórmio e acetato de etila revelaram uma banda fluorescente quando as placas foram expostas à luz ultravioleta (FIGURA 27b), compatível com a presença de flavonoides. Sabendo que esses metabólitos secundários são conhecidos pela sua ação potencial contra radicais livres (Rana; Gulliyya, 2019), esses achados podem contribuir para justificar as propriedades antioxidantes identificadas nessas amostras.

As frações hexano e clorofórmio indicaram presença de saponinas (FIGURA 27c), resultado que corrobora com o indício da presença de esteroide na fração hexano, afinal, as

saponinas são glicosídeos que possuem parte da estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares) (Simões *et al.*, 2016). Esses glicosídeos são considerados surfactantes naturais e por isso amplamente estudados na aplicação das indústrias química, farmacêutica, cosmética e até mesmo alimentícia. É um fitoquímico com atividades inseticidas, antifúngicas, antivirais, antibacterianas, e com propriedades hemolíticas. Ao se ligarem ao colesterol na membrana eritrocitária, formam um complexo insolúvel e, por meio da pressão osmótica alterada, induzem a distensão e ruptura do eritrócito causando hemólise (Liao *et al.*, 2021; Wang, D. *et al.*, 2022).

Na FIGURA 27d é possível identificar uma banda castanha no extrato cetônico e na fração clorofórmio, compatível com a presença de polifenóis. Esse resultado respalda aqueles encontrados nos ensaios *in vitro* da propriedade antioxidante e no doseamento de compostos fenólicos, onde a fração clorofórmio se destacou dentre as demais amostras.

FIGURA 27 - PLACAS DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS QUÍMICOS EM EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis*.



FONTE: A autora (2024)

NOTA: a = cromatoplasmas para análise de esteroides; b = cromatoplasmas para análise de flavonoides; c = cromatoplasmas para análise de saponinas; d = cromatoplasmas para análise de taninos; 1 = ECF (extrato cetônico folha); 2 = EEF (extrato etanólico folha); 3 = FHF (fração hexano folha); 4 = FCH (fração clorofórmio folha); 5 = FAF (fração acetato de etila folha); 6 = FRF (fração remanescente folha).

O *screening* fitoquímico realizado por GC-MS com o extrato etanólico das folhas de *Basella alba* indicou presença de alcaloides, taninos, compostos fenólicos, esteroides e carboidratos (VIRMALA; KEETHANA, 2014). Em outro estudo, o *screening* fitoquímico da *Basella alba* além de identificar taninos, esteroides e carboidrato, os autores também encontraram terpenos e saponinas (Deka *et al.*, 2017).

Plantas alimentícias configuram fontes fundamentais de compostos bioativos e, ainda que não haja consenso na quantidade recomendada para a ingestão diária de fitoquímicos na dieta humana, seus benefícios à saúde são bem documentados e abrangentes. Eles contemplam desde a redução do risco e melhora em parâmetros clínicos e bioquímicos das doenças crônicas não transmissíveis, até impactos nas patologias neurodegenerativas, na composição da microbiota intestinal e na ação antitumoral (Arias-Sánchez; Torner; Navarro, 2023; Wang, Q. *et al.*, 2022; Roszkowski, 2023). Além disso, compostos bioativos extraídos de plantas podem ser aplicados como estabilizantes naturais de produtos alimentícios, no desenvolvimento de alimentos funcionais e de nutracêuticos (Marranzano *et al.*, 2018; Piccolella *et al.*, 2019)

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS

Apesar de não estarem associadas diretamente ao crescimento e desenvolvimento das plantas, os metabólitos secundários são fundamentais para a sua proteção e evolução na interação com outros seres vivos. Além da defesa contra patógenos e herbívoros, os metabólitos atraem polinizadores e atuam na simbiose entre os vegetais e microrganismos (Borges; Amorim, 2020).

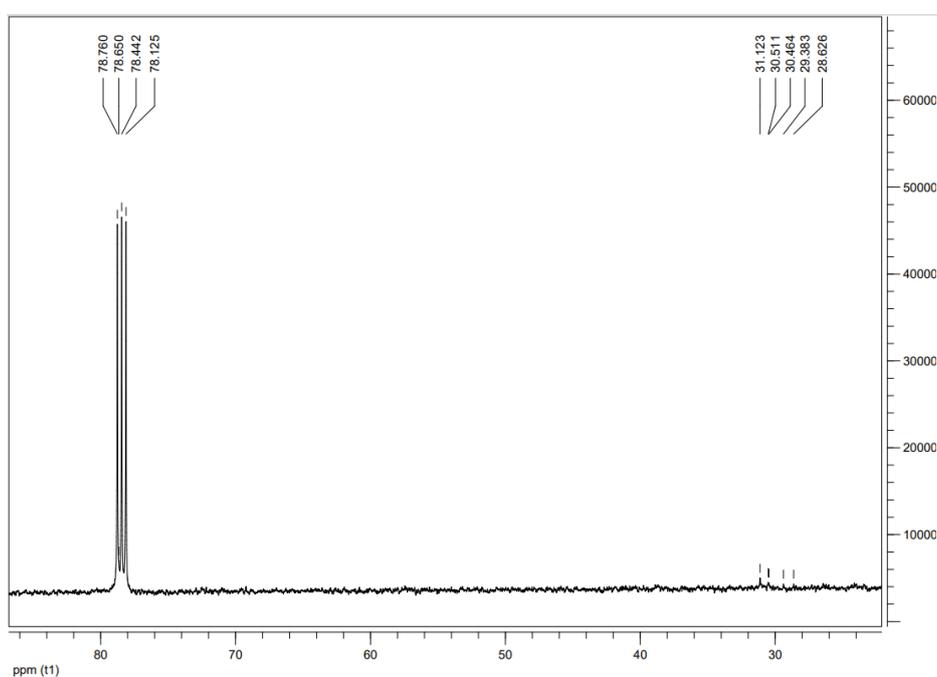
Avaliando a amplitude do território nacional, os diferentes habitats e características climáticas, são compreendidos os motivos pelos quais muitas espécies vegetais brasileiras carregam uma diversidade de compostos bioativos (Valli; Russo; Bolzani, 2018; Castro; Leda, 2023). A identificação desses componentes químicos é importante, dentre outras funções, no reconhecimento de alimentos funcionais, bem como potenciais espécies para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Foi utilizada a cromatografia em coluna de sílica gel para separação de compostos da fração hexano da folha e do extrato etanólico da folha.

##### 4.6.1 Fração hexano

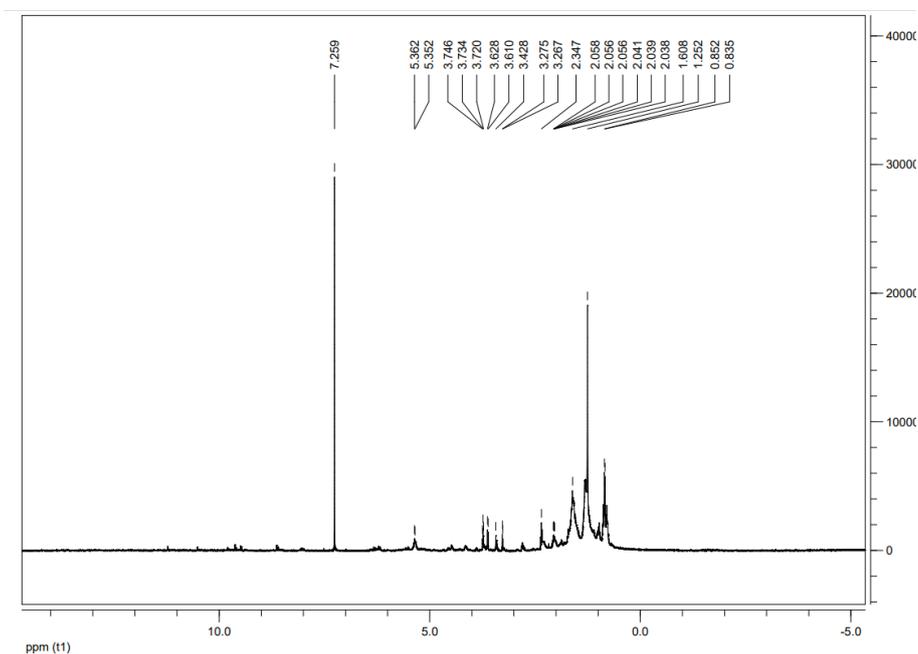
Foram coletados 248 frascos a partir da coluna realizada com a fração hexano da folha, sendo que o de número 38 (correspondente à fase móvel contendo 80% de hexano e 20% de acetato de etila) foi encaminhado para análise em RMN. Os cristais formados ao fundo do frasco foram retirados com o auxílio de uma espátula e transferidos para um frasco novo, onde foi solubilizado em aproximadamente 500  $\mu$ L de clorofórmio deuterado e pipetado para um tubo de RMN. À essa amostra deu-se o nome FH38.

No espectro RMN, o sinal  $\delta$  29 em  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 28) e  $\delta$  0,85 a 2,34 em  $^1\text{H}$  (FIGURA 29) podem ser indicativos de um hidrocarboneto de cadeia longa. Apesar da dificuldade de definição do número de carbonos presentes na molécula via RMN, pela característica apolar é esperada a existência de hidrocarbonetos na extração conduzida com hexano. Em folhas, os hidrocarbonetos normalmente são parte das ceras presentes na superfície que tem como objetivo reduzir a velocidade de evaporação da água (Taiz; Zeiger; Moller, 2021). Pela indisponibilidade de amostras não foi conduzido a análise por cromatografia em fase gasosa.

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA DA *A. tucumanensis*.



FONTE: A autora (2024)

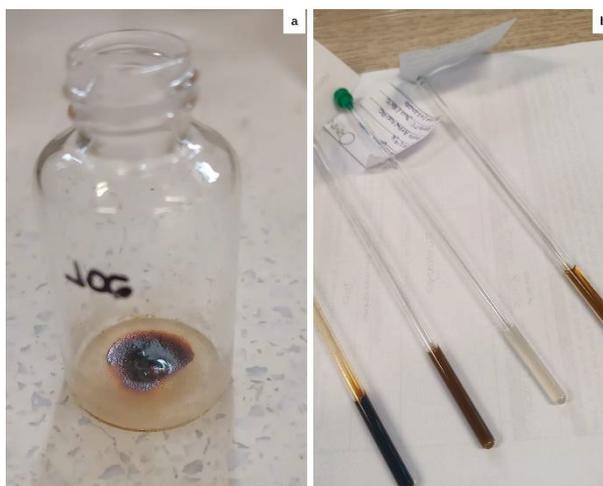
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA DA *A. tucumanensis*.

FONTE: A autora (2024)

#### 4.6.2 Extrato etanólico

Para a coluna do extrato etanólico foram coletados 127 frascos, sendo encaminhadas 3 amostras para a identificação de compostos via RMN. A primeira amostra (FE105E106) foi composta pelos frascos 105 e 106 (FIGURA 30a), extraídos por fase móvel contendo 80% de metanol e 20% de água destilada. A segunda amostra (FE28A30) foi proveniente dos frascos 28, 29 e 30, extraídos com fase móvel contendo 80% de acetato de etila e 20% de metanol e, a terceira amostra (FE64A67) foi proveniente de cristais formados nos frascos 64, 65, 66 e 67 que tiveram sua extração por fase móvel com 40% de acetato de etila e 60% de metanol. As três amostras descritas foram solubilizadas em 500  $\mu\text{L}$  de DMSO e pipetadas para tubos de RMN (FIGURA 30b).

FIGURA 30 - SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE VIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a = fração isolada do extrato etanólico da folha; c = tubos de amostras para análise via RMN.

Na amostra FE105E106 não foi possível identificar sinais que pudessem confirmar substâncias isoladas. A FE28A30 indicou presença de açúcares em virtude do sinal RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  100, possivelmente correspondente aos carbonos anoméricos e,  $\delta$  74 e 77 em  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 31) que podem estar relacionados aos carbonos hidroxilados. Corroborando com a literatura, a amostra apresentou picos no espectro de  $^1\text{H}$  em torno de  $\delta$  4,3 a 5,4 (FIGURA 32), indicativos dos hidrogênios anoméricos de açúcares.

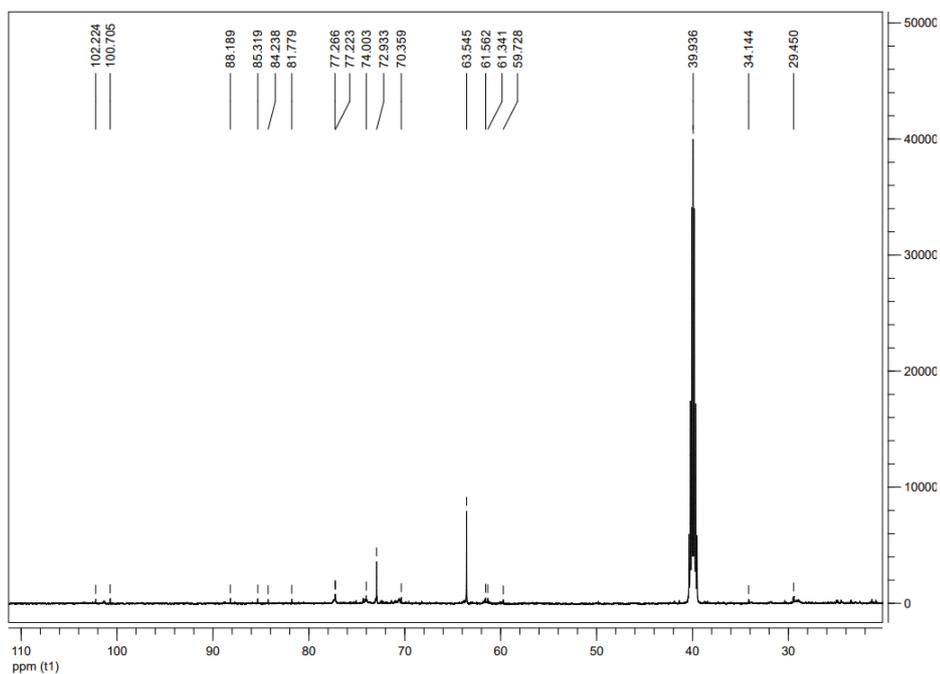
Nessa mesma amostra, o sinal  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  61 e do  $^1\text{H}$  em  $\delta$  1,23 realçam a possível presença de glicosídeos e de açúcares da classe desoxi, monossacarídeos derivados em que um grupo de OH é substituído por um hidrogênio, e seu representante de maior relevância biológica é a  $\beta$ -D-2-desoxirribose (Bellé; Sandri, 2014; Klein, 2016). No isolado estudado, o sinal  $\delta$  0,96 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  é característico da metila de uma ramnose (Romero *et al.*, 2008).

A ramnose é amplamente encontrada nos polissacarídeos da parede celular de vegetais. Junto de outros açúcares neutros como arabinose, xilose e galactose, a ramnose compõe parte das substâncias pécnicas das plantas. As ramoses dão origem às cadeias laterais constituídas de outros açúcares como arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (Koblitz, 2019). A identificação de carboidratos neutros, incluindo a ramnose, foi reportada na família Basellaceae em estudo com a bertalha (Nguyen *et al.*, 2022).

Na terceira amostra analisada (FE64A67), o espectro RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  177,6 chama atenção por se tratar de uma área de deslocamentos característicos de carbonilas em flavonoides (Kumar; Pandey, 2013; Rana; Gulliya, 2019). Quando glicosilados, sinais em  $^{13}\text{C}$  próximos a  $\delta$

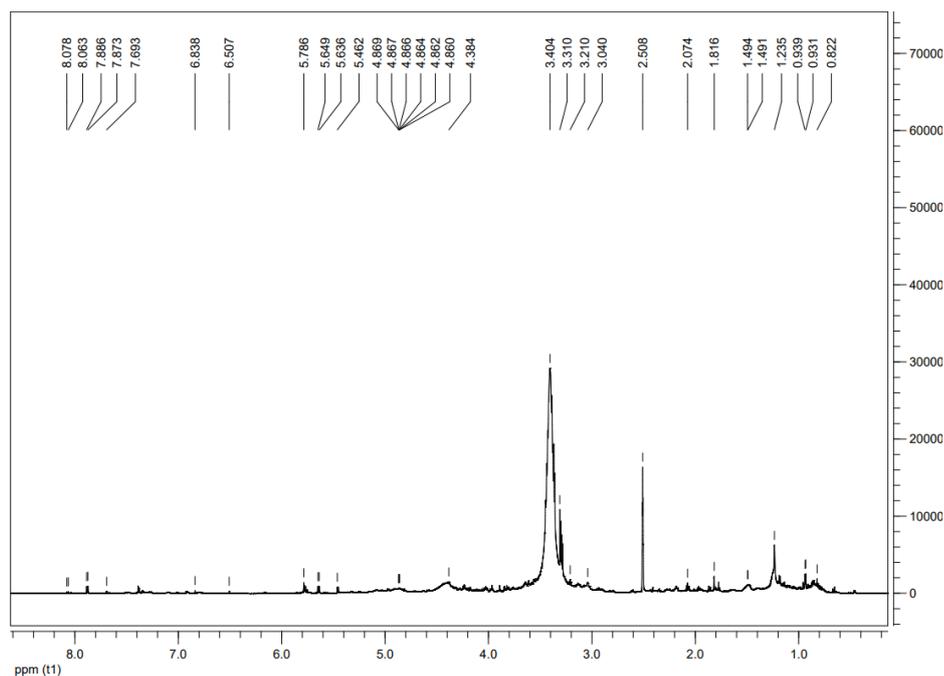
100 são observados e, as metilas da ramnose em  $\delta$  17. Conforme apresentado na FIGURA 33, é possível identificar os deslocamentos em  $\delta$  99,7 e  $\delta$  17,1.

FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE28A30) DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



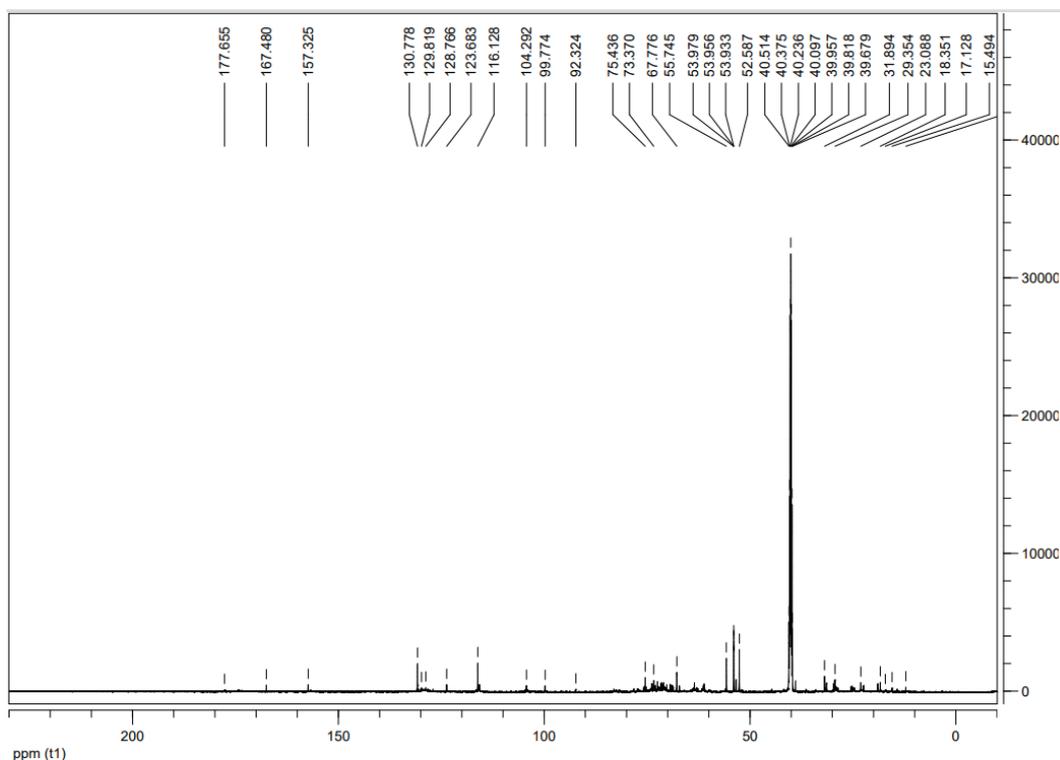
FONTE: A autora (2024).

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE28A30) DA FOLHA DA *A. tucumanensis*.



FONTE: A autora (2024).

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE64E67) DA FOLHA DA *A. tucumanensis*

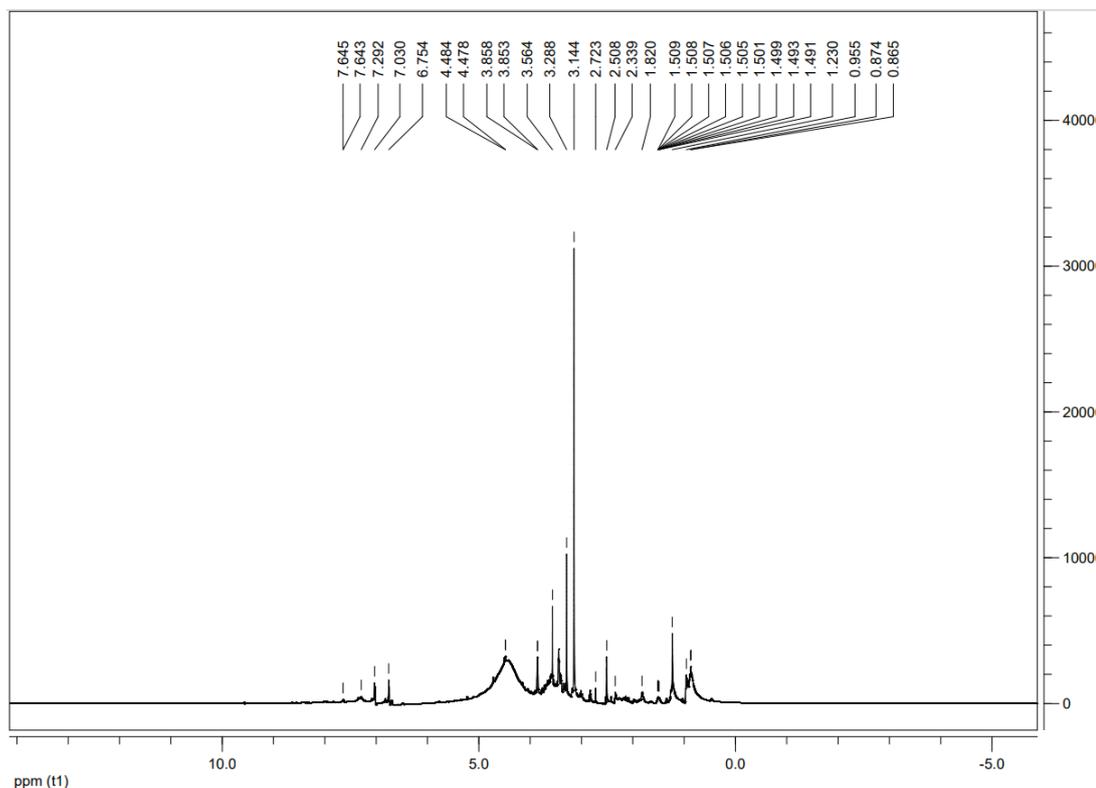


FONTE: A autora (2024).

Quando examinado o espectro RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 34), sinais em  $\delta$  4,4 podem ter relação com metoxilas de flavonoides, e  $\delta$  3,1-4,4 podem indicar os hidrogênios metílicos. Quando observados deslocamentos em  $\delta$  1,0 e 6,0, comumente atribui-se à presença da ramnose.

Ainda que novas análises sejam necessárias para confirmar qual metabólito da classe dos flavonoides faz parte das folhas da *A. tucumanensis*, os dados obtidos pela análise de RMN reforçam a presença desses compostos no *screening* fitoquímico do extrato etanólico apresentado na Tabela 5. mesmo pode-se afirmar para a ramnose, que posteriormente foi identificada na composição monossacarídica da extração aquosa das folhas estudadas, informações que estão apresentadas adiante nesta tese (TABELA 8).

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO DO EXTRATO ETANÓLICO (FE64E67) DA FOLHA DA *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

Os frascos 60, 62, 68 e 69 foram solubilizados em metanol e submetidos à coluna aberta empacotada com fase estacionária Sephadex® LH-20 (Amersham Pharmacia, G&E). Os dois primeiros foram extraídos com fase móvel contendo 40% de acetato de etila e 60% de metanol e, os outros dois 30% de acetato de etila e 70% de metanol. Foram obtidos 16 frascos. Devido crescimento fúngico, não foi possível analisar essas amostras.

A presença dos flavonoides vitexina, isovitexina e mircetina foram relatados no gênero *Anredera*, como é o caso da *A. cordifolia* (Djamil *et al.*, 2012; Djamil *et al.*, 2017; Aboshi *et al.*, 2018; Rusdiana *et al.*, 2023). A vitexina é um flavonoide com ação antioxidante identificado em diversas plantas medicinais, e dentre as suas aplicações clínicas destacam-se estudos envolvendo efeito cardioprotetor, anti-inflamatório, antineoplásico, antinociceptivo e benefícios contra alterações neurológicas, como Alzheimer, depressão e redução da capacidade cognitiva (He *et al.*, 2016; Babaei *et al.*, 2020).

Na família Basellaceae, especificamente nas folhas da *Basella alba*, foram identificados os metabólitos luteolina, apigenina e naringina (Baskaran *et al.*, 2015). Fundamentados na composição nutricional e fitoquímica, estudos reforçaram o potencial da *Basella alba* como

alimento funcional e matéria-prima no desenvolvimento de nutracêuticos (KUMA; OBEROI; AZEEZ, 2022).

#### 4.7 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* é um microcústáceo marinho que pode ser utilizado para estimar toxicidade através da concentração letal média (CL<sub>50</sub>), considerando a amostra atóxica quando concentrações acima de 1000 µg/mL não apresentam mais de 50% de larvas mortas (Meyer *et.al*, 1982).

Os extratos e frações da folha da *A. tucumanensis* não apresentaram potencial letalidade para os náuplios de *Artemia salina*, uma vez que os valores de CL<sub>50</sub> foram superiores à 1000 µg/ mL. Na TABELA 6 também é possível verificar o percentual de mortalidade para todas as concentrações testadas.

Ainda que este trabalho tenha como objeto de estudo uma espécie conhecida como alimentícia, essa informação não a isenta de provável potencial tóxico. Por isso da relevância da análise de toxicidade por testes preliminares que deverão ser complementados com outros ensaios *in vitro* e *in vivo*. Uma pesquisa publicada em 2021 testou a toxicidade da decocção de três PANC pelo ensaio de *Artemia salina*. *Amaranthus viridis* (caruru), *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) foram capazes de provocar a mortalidade dos microcústáceos (Silva *et al.*; 2021).

Os extratos aquoso, etanólico e fração acetato de etila da *Basella alba* também foram analisados pelo teste da *Artemia salina*, apresentando CL<sub>50</sub> de 875,27 µg/mL, 701,66 µg/mL e 622,99 µg/mL, respectivamente (Nur *et al.*, 2023). Esses resultados confrontam os encontrados para a *A. tucumanensis*, uma vez que maior letalidade detectada (69,70%) ocorreu para a maior concentração do extrato etanólico (1000 µg/mL), o que se aproximou da mortalidade dos náuplios na menor concentração do controle sulfato de quinidina (68,00%).

Espécies vegetais que associam baixa toxicidade com potencial antioxidante são consideradas matérias-primas promissoras ao mercado de alimentos. Formulações alimentícias que utilizam diferentes PANC têm sido testadas como alternativa que proporcionem benefícios nutricionais e organolépticos ao produto (Kumar; Oberoi; Azeez, 2021; Leite *et al.*, 2022), mais uma possível aplicação da *A. tucumanensis*.

TABELA 6 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis*. FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

AMOSTRA	Concentração (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)
ECF	50	12,50	> 1000
	100	10,26	
	250	12,20	
	500	3,03	
	750	20,41	
	1000	37,50	
FHF	50	4,76	> 1000
	100	9,76	
	250	7,50	
	500	14,71	
	750	17,95	
	1000	18,60	
FCF	50	0	> 1000
	100	6,67	
	250	9,09	
	500	4,00	
	750	11,76	
	1000	8,82	
FAF	50	6,25	> 1000
	100	3,45	
	250	3,23	
	500	7,41	
	750	0	
	1000	9,68	
FRF	50	3,92	> 1000
	100	8,82	
	250	9,76	
	500	12,50	
	750	10,42	
	1000	12,50	
EEF	50	4,88	> 1000
	100	19,44	
	250	23,68	
	500	29,73	
	750	22,50	
	1000	69,70	
QUINIDINA	50	68,00	53,09
	100	95,91	
	250	92,59	
	500	97,95	
	750	96,29	
	1000	100,00	

FONTE: A autora (2024).

Nota: EBF = extrato cetônico folha; FHF = fração hexano folha; FCF = fração clorofórmio folha; FAF = fração acetato de etila folha; FRF = fração remanescente folha; EEF = extrato etanólico folha; CL<sub>50</sub> = concentração letal para 50%.

#### 4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

No ensaio de hemólise foi possível observar que os extratos e frações da folha da *A. tucumanensis* não apresentaram capacidade hemolítica quando comparada ao padrão saponina (TABELA 7).

TABELA 7 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*

% DE HEMÓLISE SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS						
AMOSTRA	75 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	750 µg/mL	1000 µg/mL
ECF	1,86 ± 0,53 <sup>b</sup>	4,01 ± 0,47 <sup>d</sup>	2,23 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,37 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,43 <sup>a</sup>
FHF	1,43 ± 1,03 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,69 <sup>b</sup>	2,93 ± 0,65 <sup>d</sup>	6,47 ± 1,06 <sup>d</sup>	5,32 ± 0,91 <sup>d</sup>	3,57 ± 1,11 <sup>d</sup>
FAF	0,81 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,31 <sup>a</sup>
FCF	0,70 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,40 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,72 <sup>d</sup>	1,59 ± 0,69 <sup>b</sup>
FRF	0,64 ± 0,61 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,22 <sup>c</sup>	0,31 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,23 <sup>b</sup>
EEF	1,58 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,33 <sup>b</sup>
RUTINA	0,72 ± 0,54 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,13 <sup>d</sup>	2,45 ± 0,54 <sup>b</sup>	3,01 ± 0,75 <sup>d</sup>	1,70 ± 0,34 <sup>b</sup>	1,59 ± 1,16 <sup>b</sup>
SAPONINA	6,67 ± 1,29 <sup>d</sup>	31,47 ± 4,57 <sup>e</sup>	100,38 ± 2,21 <sup>f</sup>	115,01 ± 0,25 <sup>g</sup>	116,81 ± 1,33 <sup>g</sup>	127,21 ± 1,42 <sup>h</sup>

FONTE: A autora (2024).

Nota: EBF = extrato cetônico folha; FHF = fração hexano folha; FAF = fração acetato de etila folha; FCH = fração clorofórmio folha; FRF = fração remanescente folha; EEF = extrato etanólico folha. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

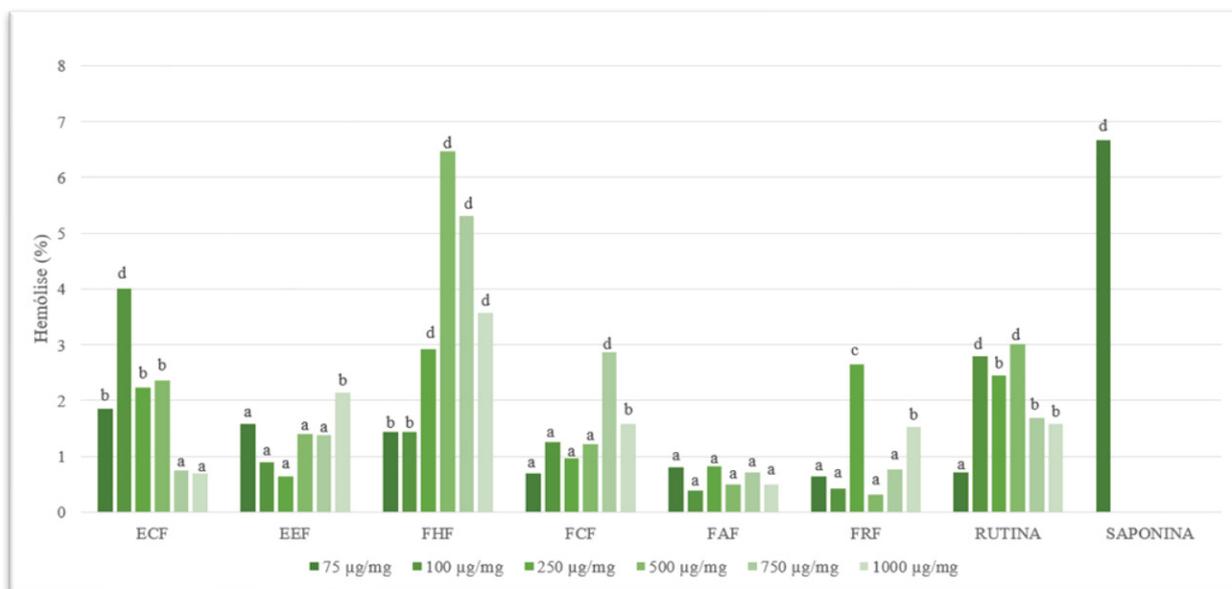
Dentre todas as concentrações das amostras estudadas, o extrato cetônico a 100 µg/mL, a fração clorofórmio a 750 µg/mL e as quatro maiores concentrações da fração hexano (250, 500, 750 e 1000 µg/mL) foram estaticamente iguais ao controle saponina na sua menor concentração (75 µg/mL). Porém, essa semelhança também foi associada ao padrão fitoquímico (rutina) nas concentrações 100 e 500 µg/mL. A diferença do efeito hemolítico com a menor concentração da saponina em relação ao extrato e frações da *A. tucumanensis* fica ainda mais evidenciada na FIGURA 35.

A rutina é um flavonoide glicosilado derivado da quercetina, encontrada em fontes alimentares como café, chá preto, maçã, uva, frutas cítricas e trigo serraceno. À esse metabólito são atribuídas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, anticancerígena, cardioprotetora, hepatoprotetora, e neuroprotetora (Semwal *et al.*, 2021; Muvhulawa *et al.*, 2022; Tobar-Delgado *et al.*, 2023)

As saponinas são glicosídeos considerados surfactantes naturais. Ao se ligarem ao colesterol na membrana eritrocitária formam um complexo insolúvel e, por meio da pressão

osmótica alterada induzem a distensão e ruptura do eritrócito, causando hemólise. Elas têm sido amplamente estudadas na aplicação das indústrias química, farmacêutica, cosmética e até alimentícia. Trata-se de um metabólito com atividades inseticidas, antifúngicas, antivirais e antibacterianas, associadas às propriedades hemolíticas supracitadas (Liao *et al.*, 2021; Wang, D. *et al.*, 2022).

FIGURA 35 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA *A. tucumanensis* COMPARADOS À SAPONINA



FONTE: A autora (2024).

NOTA: ECF = extrato cetônico folha; EEF = extrato etanólico folha; FHF = fração hexano folha; FCH = fração clorofórmio folha; FAF = fração acetato de etila folha; FRF = fração remanescente folha. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

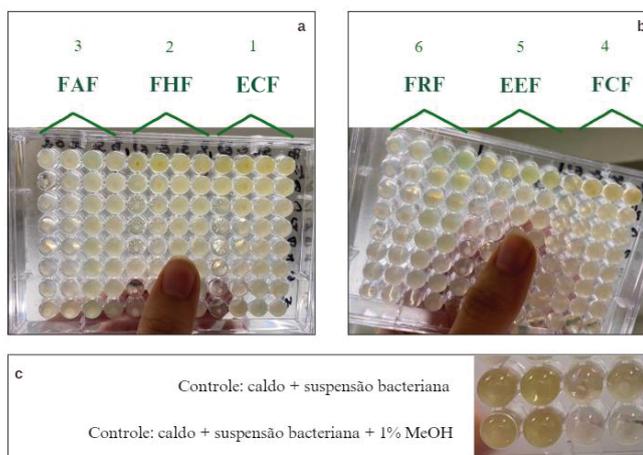
Desfecho diferente foi publicado por Nur *et al.* (2023) na análise da *Basella alba*, quando extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentaram potencial capacidade de hemólise quando comparados ao controle positivo. Quanto às publicações com espécies do mesmo gênero da *A. tucumanensis*, uma pesquisa com o extrato de folhas de *A. cordifolia* foi capaz de inibir a hemólise de glóbulos vermelhos em solução hipotônica, sugerindo provável atividade anti-inflamatória (Sutrisno *et al.*, 2016).

#### 4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De acordo com a metodologia conduzida, após a incubação das microplacas em estufa a 37°C por 24 horas, os poços que apresentaram turbidez indicaram crescimento bacteriano e aqueles com conteúdo límpido caracterizariam ação antimicrobiana da amostra.

Conforme observado na FIGURA 36a e FIGURA 36b, extratos e frações da folha da *A. tucumanensis* não inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em nenhuma concentração, sugerindo CIM superiores a 1000 µg/mL. Na FIGURA 36c é possível notar que os controles contendo caldo Mueller Hinton II, suspensão bacteriana e metanol também não impediram o crescimento das cepas analisadas. Para a gentamicina padrão, as CIMs foram 0,24, 10,4, 0,29 e 0,19 µg/mL, respectivamente, e estão de acordo com os resultados de Kidsley *et al.* (2018) e Tam *et al.* (2006).

FIGURA 36 – MICROPLACAS DO ENSAIO ANTIBACTERIANO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis* APÓS INCUBAÇÃO



FONTE: A autora (2024).

NOTA: a e b = microplacas após incubação em estufa para análise de crescimento bacteriano; c = poços da microplaca referente aos controles; FAF = fração acetato de etila folha; FHF = fração hexano folha; ECF = extrato cetônico folha; FRF = fração remanescente folha; EEF = extrato etanólico folha; FCF = fração clorofórmio folha; MeOH = metanol.

Diferente dos resultados encontrados nesse estudo, em uma publicação realizada em 2017 com extratos metanólicos das folhas de *Basella alba* e *Basella rubra*, ambas as amostras mostraram CIM a 250 µg/mL para *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*, e *Klebsiella pneumonia*. Para *Staphylococcus aureus* a CIM foi a 500 µg/mL e, para *Aspergillus niger* foi 100 µg/mL (Adegoke; Ojo, 2017). Em estudo anterior, o extrato metanólico da *Basella alba* apresentou atividade antimicrobiana considerada moderada pelos autores para *Pseudomonas aeruginosa* e

*Bacillus subtilis*, porém atividade fraca para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* (Azad *et al.*, 2013).

Extrato aquoso e fração clorofórmio das folhas da *A. cordifolia* apresentaram CIM que variaram entre 50 a 60 µg/mL para três bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*) e cinco gram negativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes*) (Tshikalange; Meyer; Hussein, 2005). Ao estudar extrato o etanólico e frações das folhas de *A. cordifolia*, a fração hexano se destacou na atividade antibacteriana com CIM próxima de 500 µg/mL, em especial contra *Bacillus subtilis* (Leliqia; Sukandar; Fidrianny, 2017).

O estudo do óleo essencial das folhas da *A. cordifolia* não demonstrou atividade antimicrobiana para 60% das bactérias analisadas. Para *Bacillus cereus* e *Streptococcus faecalis* a CIM foi de 100 µg/mL, para *Bacillus subtilis* foi encontrada CIM de 50 µg/mL, e de 25 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (Souza *et al.*, 2014).

A literatura não é unânime ao estabelecer um padrão de referência do nível de inibição bacteriana aceitável para produtos naturais. Enquanto alguns autores estabelecem escalas de CIM, outros comparam com antibióticos padrões. Quanto ao uso de plantas medicinais como recursos antimicrobianos, é comum notar melhor eficácia dos óleos essenciais ao comparados com extratos, isso porque o método favorece a capacidade de extração de classes químicas distintas (Nascimento *et al.*, 2007; Rao; Chen; McClements, 2019).

#### 4.10 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A capacidade funcional dos polissacarídeos está relacionada a sua caracterização estrutural, como o tipo de monômero, tipos e posições das ligações glicosídicas, além das características físicas como viscosidade, solubilidade, gelatinização (Zhang *et al.*, 2017). Dessa forma, justifica-se a relevância da extração e identificação dos polissacarídeos, especialmente de espécies vegetais pouco exploradas.

##### 4.10.1 Polissacarídeos do extrato aquoso e frações

Aproximadamente 150g das folhas secas e deslipidificadas foram extraídas com água sob refluxo a 100 °C, por 2 horas. Após centrifugado, o extrato foi filtrado e o resíduo levado novamente à extração. Essa etapa foi realizada 5 vezes. Após diálise de 48 horas, a amostra foi

congelada e liofilizada, obtendo-se a fração ATFW, a qual apresentou rendimento de 24,5% (TABELA 8). O cálculo do rendimento das amostras foi baseado em relação ao peso seco das folhas deslipidificadas que foram submetidas a extração.

A análise de composição monossacarídica da fração ATFW indicou o maior teor de ácido urônico (15,2%) dentre as demais amostras estudadas, além da presença de arabinose, galactose fucose e glucose em razão molar decrescente (TABELA 8). Ácidos urônicos são unidades estruturais de diversos polissacarídeos e configuram os principais elementos químicos das pectinas (Cui, 2005), fato que justifica o teor encontrado na fração aquosa, uma vez que pectinas são prontamente extraídas da parede celular vegetal com água.

TABELA 8 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*

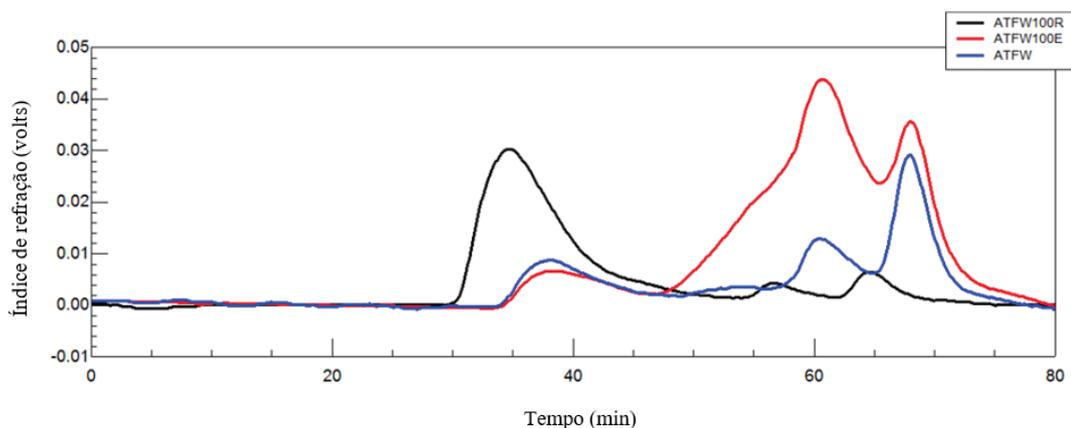
Frações	Rendimento		Monossacarídeos (%)							
	g	%	Ram	Fuc	Ara	Xy	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
ATFW	36,76	24,50	-	3,3	68,2	-	-	10,2	3,1	15,2
ATFW100E	0,21	21,00	4,1	-	75,4	0,6	-	13,6	0,6	5,8
ATFW100R	0,59	59,00	3,9	-	39,9	1,1	0,7	33,6	18,6	2,2

FONTE: A autora (2024).

Nota: ATFW = extrato aquoso; ATFW100E = extrato aquoso eluído pela membrana de 100kDa; ATFW100R = extrato aquoso retido na membrana de 100kDa; Ram = ramnose; Fuc = fucose; Ara = arabinose; Xy = xylose; Man = manose; Gal = galactose; Glc = glucose.

O perfil de eluição em HPSEC apresentado na FIGURA 37 demonstra a presença de 2 picos (em torno de 40 e 60 min), sugerindo a existência de compostos com diferentes massas molares na amostra ATFW. Na análise de RMN e corroborando com a composição monossacarídica supracitada, no mapa de correlação HSQC-DEPT (FIGURA 38) os sinais C-1/H-1 em  $\delta$  104,5/4,59;  $\delta$  76,6/3,96;  $\delta$  74,9/3,68;  $\delta$  72,8/3,65;  $\delta$  71,5/3,57 e  $\delta$  61,4/3,81 foram atribuídos às unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 4) ligadas, que podem ser encontradas em arabinogalactanas do tipo I (Nascimento; Iacomini; Cordeiro, 2016). O sinal em 103,4/4,46 é sugestivo da presença de unidades de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 3) ligadas, que podem ser encontradas em arabinogalactanas do tipo II (Nascimento; Iacomini; Cordeiro, 2016). Sinais em  $\delta$  107,6/5,06,  $\delta$  107,2/5,20 e  $\delta$  108,0/5,38 correspondem aos carbonos anoméricos de unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil que estão presentes nas cadeias laterais das arabinogalactanas.

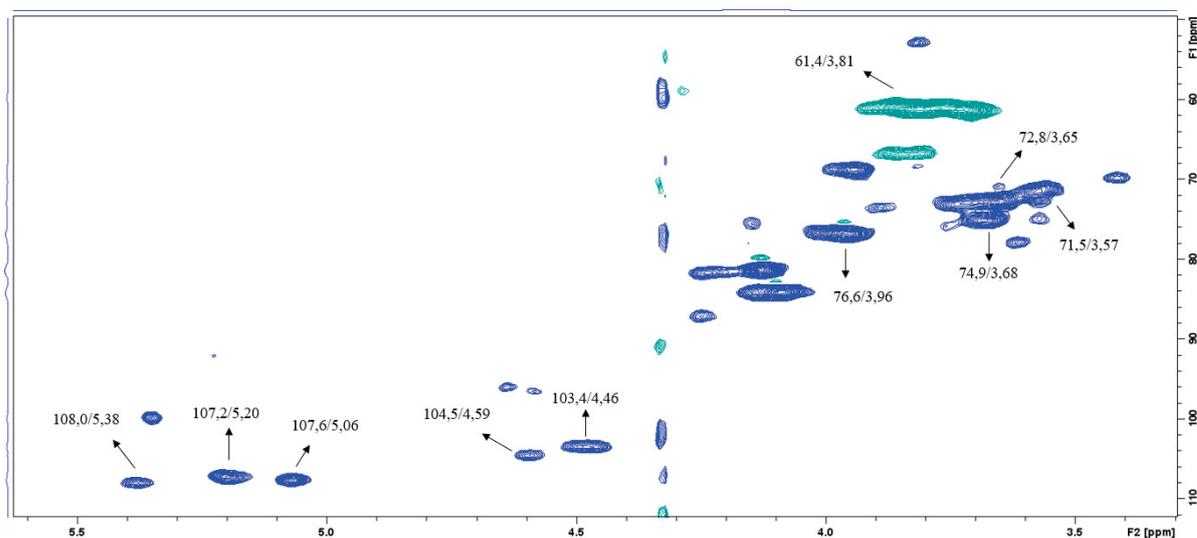
FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*



FONTE: A autora (2024).

Nota: ATFW = extrato aquoso; ATFW100E = extrato aquoso eluído pela membrana de 100kDa; ATFW100R = extrato aquoso retido na membrana de 100kDa.

FIGURA 38 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) EXPRESSOS EM PPM



FONTE: A autora (2024).

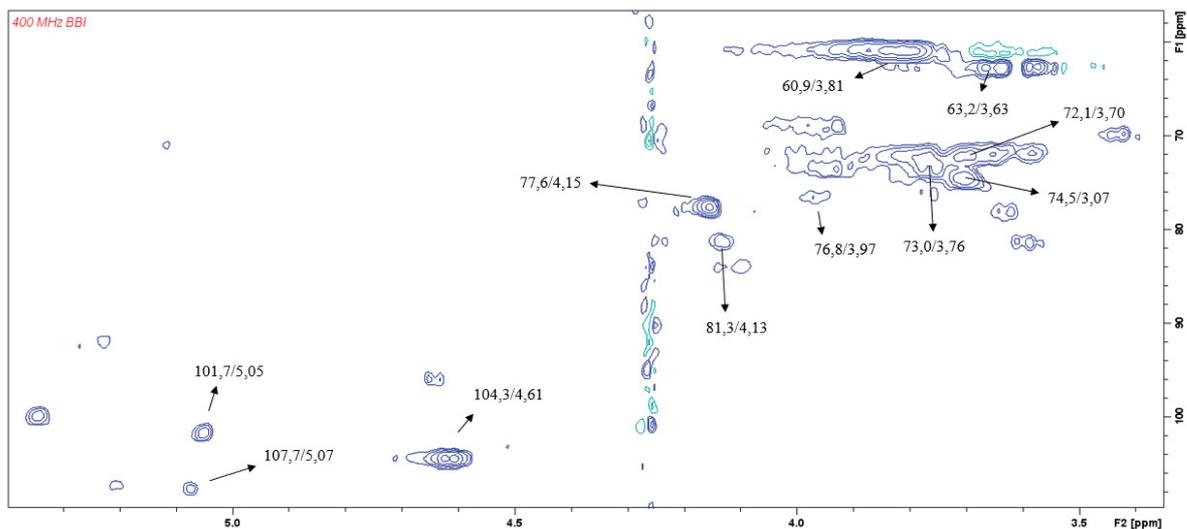
Com objetivo de otimizar a identificação dos polissacarídeos da fração ATFW, aproximadamente 1 g da amostra foi diluída em água destilada e submetida ao processo de purificação por ultrafiltração em membranas sob pressão. Foram obtidas as frações eluída (ATFW100E) e retida (ATFW100R), com rendimento de 21% e 59%, respectivamente (TABELA 8). O cálculo do rendimento foi realizado com base no peso inicial da amostra (1g) e o peso final de cada fração após liofilização.

Conforme análise da composição monossacarídica, a amostra ATFW100E apresentou predominância de arabinose (75,4%). Apesar da arabinose também ter sido proporcionalmente mais prevalente em relação aos demais monossacarídeos na fração ATFW100R, o teor foi de 39,9%, seguido de 33,6% de galactose (TABELA 8). O perfil de eluição em HPSEC demonstra que a ultrafiltração viabilizou a separação dos compostos (FIGURA 37), uma vez que a fração ATFW100R apresentou o pico em torno dos 35 min (contendo os polissacarídeos de alta massa molar), enquanto a fração ATFW100E apresentou o pico em torno dos 60 min de eluição (contendo os polissacarídeos de baixa massa molar).

De acordo com o mapa de correlação HSQC-DEPT (FIGURA 39) foi possível confirmar a presença da AG-I na fração ATFW100E, sugerida pela composição monossacarídica e evidenciada pelos sinais C-1/H-1 em  $\delta$  104,3/4,61;  $\delta$  77,6/4,15;  $\delta$  74,5/3,07;  $\delta$  73,0/3,76;  $\delta$  72,1/3,70 e  $\delta$  60,9/3,81, atribuídos às unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 4) ligadas. Sinais em  $\delta$  107,7/5,07 correspondem ao carbono anomérico das unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (FIGURA 39). Essa mesma fração também apresentou um sinal incomum em  $\delta$  101,7/5,05, indicativo de unidades de beta-L-arabinofuranose ( $\beta$ -L-Araf). A possível presença da  $\beta$ -L-arabinana chama atenção por ser atípico e, portanto, com poucos relatos na literatura. Estudos publicados que identificaram essa característica envolveram folhas de uma espécie vegetal da família do louro e nativa da Índia, denominada *Litsea glutinosa*, no bagaço e na polpa da azeitona, no chamado pinho siberiano, e na polpa de um fruto típico do Brasil chamado guavira e no fruto *Prunus spinosa* L., da família Rosaceae (Cardoso *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2013; Shakhmatov *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2019; Capek; Uhliaríková; Košťalová, 2023).

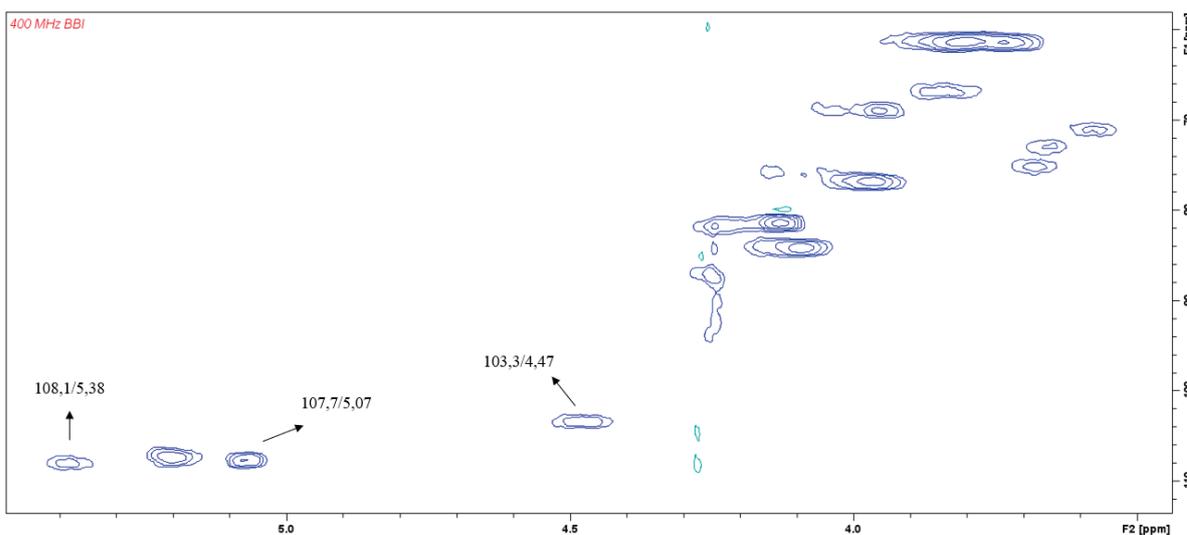
Na fração ATFW100R, pela análise do mapa de correlação HSQC-DEPT (FIGURA 40), foi possível confirmar a presença da AG-II, polissacarídeo formado por unidades de galactose em sua cadeia principal, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), com ramificações em posições O-3 e O-6 de cadeias ou terminais de arabinose (citação). Essa confirmação se deu pela presença dos sinais de C-1/H-1 em  $\delta$  108,1/5,38,  $\delta$  107,2/5,20 e  $\delta$  107,7/5,07 que correspondem ao carbono anomérico de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil e, aquela de C-1/H-1 em  $\delta$  103,3/4,47, referente ao carbono anomérico de  $\beta$ -D-galactopiranosil 3-O-substituída.

FIGURA 39 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW100E COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) EXPRESSOS EM PPM.



FONTE: A autora (2024)

FIGURA 40 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFW100R COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) EXPRESSOS EM PPM.



FONTE: A autora (2024).

#### 4.10.2 Polissacarídeos do extrato alcalino e frações

Após extração aquosa, o resíduo da amostra foi submetido à extração alcalina com solução de NaOH a 10% por 4 vezes. O extrato foi centrifugado após as etapas de filtragem, neutralização e diálise, dando origem às frações sobrenadante (ATFAS) e precipitado (ATFAP)

com os respectivos rendimentos: 9,20% e 4,39% (TABELA 9), baseado em relação ao peso seco das folhas deslipidificadas que foram submetidas a extração.

A fração ATFAS apresentou predominância de arabinose na composição monossacarídica (57,5%), seguida de 23,4% de glucose e galactose (11,7%) (TABELA 9). Ao comparar o teor de ácidos urônicos é possível perceber que as frações alcalinas apresentaram menores percentuais que as frações aquosas.

O perfil de eluição por HPSEC da fração ATFAS demonstrou 2 picos distintos (em torno dos 55 min e 62 min), sugerindo a presença de 2 populações de polissacarídeos com massas molares diferentes (FIGURA 41). Devido a presença de amido, observada por análise de ressonância magnética nuclear (HSQC-DEPT, dados não mostrados) e pela presença de glucose, a fração foi tratada com  $\alpha$ -amilase seguida por diálise, originando a fração ATFASA. Como esperado, pode-se observar uma redução no % de glucose na análise da composição monossacarídica dessa fração (TABELA 9), de 23,4% para apenas 6,3%, comprovando a digestão do amido. Os outros monossacarídeos presentes foram predominantemente a arabinose (66,4%) e galactose (16,3%)

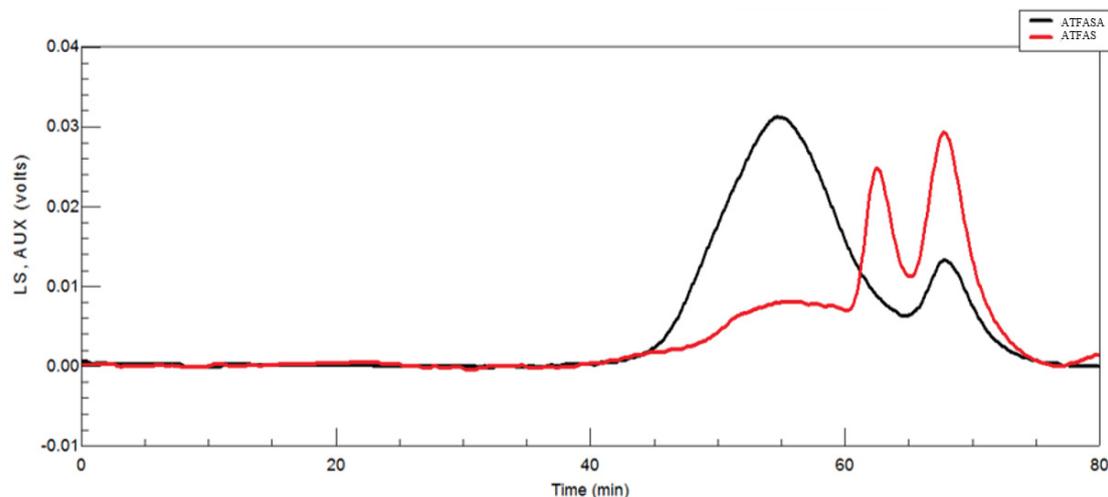
TABELA 9 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO ALCALINO E FRAÇÕES OBTIDOS DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis* PARA IDENTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Frações	Rendimento		Monossacarídeos (%)							
	g	%	Ram	Fuc	Ara	Xy	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
ATFAS	13,80	9,20	-	0,9	57,5	3,6	-	11,7	23,4	2,9
ATFASA	1,29	43,00	3,3	0,1	66,4	0,3	0,8	16,3	6,3	6,6
ATFAP	6,59	4,39	-	-	-	-	-	-	96,7	3,3
ATFAPA	2,39	79,66	2,1	1,4	20,7	25,0	9,3	3,7	34,7	3,2

FONTE: A autora (2024).

Nota: ATFAS = extrato alcalino sobrenadante; ATFASA = extrato alcalino sobrenadante tratado com amilase; ATFAP = extrato alcalino precipitado; ATFASA = extrato alcalino precipitado tratado com amilase. Ram = ramnose; Fuc = fucose; Ara = arabinose; Xy = xylose; Man = manose; Gal = galactose; Glc = glucose.

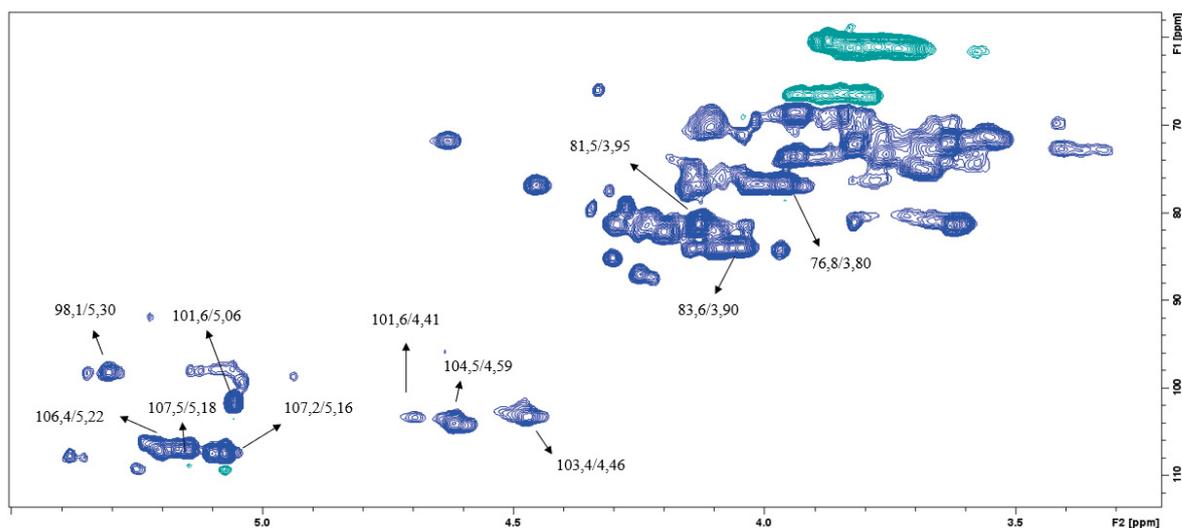
FIGURA 41 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SOBRENADANTES DO EXTRATO ALCALINO OBTIDO DA FOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL *A. tucumanensis*.



FONTE: A autora (2024).

Na FIGURA 41 é possível observar a eficácia da purificação supracitada, uma vez que pode ser observado o desaparecimento do pico com tempo de eluição de aproximadamente 62 min no experimento de cromatografia de gel permeação. A análise do mapa de correlação HSQC-DEPT dessa fração (FIGURA 42) mostra a presença de arabinogalactanas/arabinanas como observado para a fração extraída com água (ATFW), devido a presença dos sinais anoméricos em  $\delta$  104,5/4,59 e  $\delta$  103,4/4,46 provenientes de unidades de  $\beta$ -D-Galp, sinais em  $\delta$  106,4/5,22,  $\delta$  107,2/5,16 e  $\delta$  107,5/5,08 provenientes de unidades de  $\alpha$ -L-Araf encontradas em arabinogalactanas. Assim como na fração ATFW100E, a ATFASA também apresentou sinais C-1/H-1 em  $\delta$  101,6/5,06 indicando a presença de unidades de  $\beta$ -L-Araf. Finalmente o sinal anomérico em 98,1/5,30 pode ser atribuído a unidades de  $\alpha$ -L-Rhap. Experimentos futuros, como a análise de metilação, são necessários para a comprovação da estrutura química fina, onde serão comprovados e quantificados os tipos de ligações glicosídicas presentes na amostra

FIGURA 42 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC-DEPT) DA FRAÇÃO ATFASA COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) EXPRESSOS EM PPM.



FONTE: A autora (2024).

A fração precipitada do extrato alcalino (ATFAP) apresentou-se composta principalmente por glucose (96,7%) proveniente do amido, como observado por análise de HSQC (dados não mostrados) e dessa maneira, não foi posteriormente purificada.

Apesar das plantas apresentarem celulose, hemicelulose, pectina e lignina como elementos majoritários da parede celular, arabinogalactanas (AG) podem ser identificadas com frequência. As AG são polissacarídeos formados por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-galactopiranoses e classificadas em tipo I e tipo II. Nas arabinogalactanas do tipo I (AG-I) a galactose da cadeia principal é formada por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), ramificada por unidades de arabinose na posição O-3. Nas arabinogalactanas do tipo II (AG-II) a galactose é formada por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e a arabinose pode ser observada nas posições O-3 e/ou O-6. AG-II podem estar associadas com proteína, e quando isso ocorre são denominadas arabinogalactana-proteínas (AGPs) (Cui, 2005; Ghosh; Takahashi; Kotake, 2023).

Estudos com plantas medicinais têm demonstrado o potencial efeito imunomodulador de polissacarídeos, incluindo AG-I, AG-II e pectinas como homogalacturonanas e ramnogalacturonanas tipo I e tipo II. Vários mecanismos de ação são citados pela literatura, que vão desde a interação com o sistema complemento, até a modulação da atividade dos macrófagos e do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Dion; Chappuis; Ripoll, 2016; Seyfried *et al.*, 2016). AG-II são mais comumente encontradas em tecidos vegetais. Em folhas, AG foram identificadas em espécies como *Moringa oleífera*, *Sedum dendroideum*, *Raphanus*

*sativus L.*, e nas folhas do avocado (Inaba *et al.*; 2015; Oliveira *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Yamassaki *et al.*, 2018).

Investigações prévias com espécies da família Basellaceae e do gênero *Anredera* exploraram, em parte, a composição de carboidratos. A *Basella rubra*, PANC popularmente conhecida como bertalha, apresentou galactose e arabinose como monossarídeos predominantes em extração aquosa das folhas (Dong *et al.*, 2012), corroborando com os achados dessa pesquisa. O potencial antiadesivo *in vitro* do extrato aquoso da *Basella alba*, também pertencente à família Basellaceae e tradicionalmente usada contra gastrite, foi avaliado frente ao *Helicobacter pylori*. Os autores atribuíram a possível interação dos polissacarídeos presentes na amostra, em especial as AG, com a adesão da bactéria. Esses achados sugerem novas investigações que possam elucidar a interação dos carboidratos identificados no bloqueio das adesinas como um possível desenvolvimento de fármacos eficazes e acessíveis (Nguyen *et al.*, 2022). Um estudo publicado em 2023 desenvolveu um hidrogel a partir do polissacarídeo oxidado das folhas da *A. cordifolia*, o objetivo foi analisar a aplicação tópica de um fármaco capaz de contribuir para a cicatrização de feridas diabéticas, sendo considerado um promissor recurso terapêutico para acelerar o processo de recuperação tecidual (Shen *et al.*, 2023).

Pesquisas sobre a composição dos extratos de folhas são há muitas décadas motivadas pela identificação de metabólitos, especialmente pelas potenciais atividades biológicas. Assim como aos metabólitos secundários das plantas, à alguns polissacarídeos são atribuídas ações antioxidantes, imunomoduladoras, antitumorais, antimicrobianas e antivirais, por isso recebem o nome polissacarídeos bioativos (Zhang *et al.*, 2020; Drira *et al.*, 2021). Mais recentemente as interações entre polifenol-polissacarídeo presentes nas plantas tem ganhado foco, pois parecem influenciar tanto nas suas características físico-químicas como nas propriedades funcionais (Guo *et al.*, 2022).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi o primeiro estudo a avaliar características físico-químicas, atividades biológicas *in vitro*, toxicidade preliminar, composição de mono e polissacarídeos da espécie vegetal *A. tucumanensis*.

Quanto às características físico-químicas foi possível observar que tanto as folhas como o caule apresentaram alto teor de umidade e baixa acidez, indicando maior susceptibilidade à deterioração como esperado para esse tipo de amostra. O teor proteico e lipídico são sugestivos para futuras investigações quanto à caracterização de aminoácidos e ácidos graxos presentes nessa PANC, especialmente como forma de despertar maior interesse alimentício. O teor total de fibras se assemelhou à demais investigações com espécie da família Basellaceae, o que reforça a qualidade nutricional como hortaliça.

Folhas e caule apresentaram propriedade antioxidante para os três ensaios realizados, sendo que as frações clorofórmio e acetato de etila do caule se destacaram em dois desses métodos, assim como ocorreu para o teor de fenólicos totais. O estudo fitoquímico preliminar de extratos e frações da folha sugeriu a presença de antraquinonas, esteroides, saponinas, polifenóis, taninos e flavonoides.

Esse último grupo de metabólitos, os flavonoides, pareceu estar presente no isolado do extrato etanólico da folha quando submetido à ressonância magnética nuclear. O baixo rendimento dos extratos pode ser citado como uma limitação para ampliar as tentativas de isolamento de compostos bioativos. Junto a isso, o incidente com a perda da primeira coleta e o período de pandemia que demandaram ajuste do cronograma da pesquisa dificultaram maior exploração das frações do caule.

A ausência de toxicidade nos testes preliminares com extrato e frações da folha enfatiza o potencial da espécie como alimento funcional e matéria-prima de interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

Arabinogalactanas do tipo I e II foram identificadas nos extratos e frações purificadas da folha, com destaque para indícios da  $\beta$ -L-arabinana, um homopolissacarídeo atípico. O fato de polissacarídeos, assim como metabólitos secundários, estarem associados a diversas atividades biológicas endossa a notoriedade da *A. tucumanensis*. Por isso, a condução de futuros ensaios que visem elucidar a estrutura química desses polímeros será essencial na compreensão, não apenas da sua aplicabilidade na saúde, mas as possíveis interações com os próprios metabólitos secundários da espécie.

O desenvolvimento da sociedade também está pautado no conhecimento da sua biodiversidade, afinal, dela adquirimos produtos que viabilizam o acesso aos alimentos e medicamentos. Dessa forma, os achados apresentados nessa tese poderão nortear novas pesquisas e condutas a fim de beneficiar a saúde da população, agregando valor a sociobiodiversidade por se tratar de uma espécie brasileira nativa, de ampla ocorrência no Paraná e carente de dados científicos.

## REFERÊNCIAS

- ABOSHI, T.; ISHIGURI, S.; SHIONO, Y.; MURAYAMA, T. Flavonoid glycosides in Malabar spinach *Basella alba* inhibit the growth of *Spodoptera litura* larvae. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 82, n.1, p. 9-14, Jan. 2018. DOI: 10.1080/09168451.2017.1406301.
- ADEGOKE, G. O.; OJO, O. A. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activities in the Leaf, Stem and Fruit Fractions of *Basella Alba* and *Basella Rubra*. **Plant**, v. 5, n. 5, p. 73, Oct. 2017. DOI:10.11648/j.plant.20170505.11
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, Jun, 2013. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002
- ALBA, T. M.; TESSARO, E.; SOBOTTKA, A. M. Seasonal effect on phenolic content and antioxidant activity of young, mature and senescent leaves from *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (Basellaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–8, 2024. DOI: 10.1590/1519-6984.254174
- AOAC Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18 ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 2005.
- ARIAS- ROSZKOWSKI, R. A.; TORNER, L.; FENTON NAVARRO, B. Polyphenols and Neurodegenerative Diseases: Potential Effects and Mechanisms of Neuroprotection. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 1–15, Jul. 2023. DOI: 10.3390/molecules28145415
- ASLAM, F.; RASOOL, N.; RIAZ, M.; ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; ABBAS, M.; BUKHARI, T. H.; BUKHARI, I. H. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS Profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. p. 567–578, Jan. 2011.
- ASTUTI, S. M.; SAKINAH, M. A.; ANDAYANI, R. B.; RISCH, A. Determination of saponin compound from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis plant (binahong) to potential treatment for several diseases. **Journal of agricultural science**, n.3, v.4, p. 224, Nov. 2011. DOI: doi:10.5539/jas.v3n4p224
- AZAD, A. K.; AZIZI, W. M.; BABAR, Z. U. M.; LABU, Z.; ZABIN, S. An overview on phytochemical, anti-inflammatory and anti-bacterial activity of *Basella alba* leaves extract. **Middle East Journal of Scientific Research**, v. 14, n. 5, p. 650–655, Jan. 2013. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2013.14.5.71225
- BABAEI, F.; MOAFIZAD, A.; DARVISHVAND, Z.; MIRZABABAEI, M.; HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. **Food Science & Nutrition**, v.14, n.8, p. 2569–2580, Apr. 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1567.
- BAI, X.; BIAN, Z.; ZHANG, M. Targeting the Nrf2 signaling pathway using phytochemical ingredients: A novel therapeutic road map to combat neurodegenerative diseases. **Phytomedicine**, v. 109, p. 154582, Jan. 2023. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154582.

BALDERMANN, S.; BLAGOJEVIĆ, L.; FREDE, K.; KLOPSCH, R.; NEUGART, S.; NEUMANN, A.; NGWENE, B.; NORKEWEIT, J.; SCHRÖTER, D.; SCHRÖTER, A.; SCHWEIGERT, F. J.; WIESNER, M.; SCHREINER, M. Are Neglected Plants the Food for the Future? **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, n. 2, p. 106–119, Jun. 2016. DOI: 10.1080/07352689.2016.1201399.

BARI, I. N.; KATO-NOGUCHI, H.; IWASAKI, A.; SUENAGA, K. Allelopathic Potency and an Active Substance from *Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis. **Plants**, v. 8, n. 5, May. 2019. DOI: 10.3390/plants8050134

BASKARAN, G.; SALVAMANI, S.; AHMAD, S.A.; SHAHARUDDIN, N.A.; PATTIRAM, P.D.; SHUKOR, M.Y. HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytocomponent investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. **Drug design, development and therapy**, p. 509-517, Jan. 2015. DOI: 10.2147/DDDT.S75056

BELLÉ, P.L.; SANDRI, S. **Bioquímica Aplicada - Reconhecimento e Caracterização de Biomoléculas**. São Paulo: Editora Saraiva, 2014. E-book. ISBN 9788536519623. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536519623/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIERBELE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Springer Science & Business Media, 2009, 1070p.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. Jul. 1996. DOI. 10.1006/abio.1996.0292.

BORGES, L.P.; AMORIM, V.A. metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, Mar. 2020.

BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1ª ed. Curitiba: Editora Appris, 141 p., 2015

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 28, p. 25 30, 1995. DOI. 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Resolução RDC n. 243, de 26 de julho de 2018. Requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jul. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos\\_regionais\\_brasileiros\\_2ed.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos_regionais_brasileiros_2ed.pdf). Acesso em: 15 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**. 6a edição, v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para Comprovação de Segurança de Alimentos e Ingredientes**. 6a edição, v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019b.

CAMPANARO, A.; TOMMASI, N.; GUZZETTI, L.; GALIMBERTI, A.; BRUNI, I.; LABRA, M. DNA barcoding to promote social awareness and identity of neglected, underutilized plant species having valuable nutritional properties. **Food Research International**, v. 115, p. 1–9, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.031.

CAPEK, P.; UHLIARIKOVÁ, I.; KOŠŤALOVÁ, Z. An arabinan isolated from the antioxidant active fraction of wild blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). **Carbohydrate Research**, v. 523, p. 108730, Jan. 2023. DOI: 10.1016/j.carres.2022.108730.

CARDOSO, S.M.; FERREIRA, J.A.; MAFRA, I.; SILVA, A.M.S.; COIMBRA, M.A. Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7124–7130, Jul. 2007. DOI: 10.1021/jf070769w 17.

CARDOSO, S.M.; SILVA, A.M.S.; COIMBRA, M.A. Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains, **Carbohydrate Research**, v.337, N.10, p. 917–924, May. 2002. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00082-4.

CARVALHO, A. P. A. de; CONTE-JUNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, p. 534–548, May. 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.03.006.

CARVALHO, J. L. S. de; CUNICO, M. M.; DIAS, J. de F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031–1035, Jun. 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400034.

CASTRO, M.R.; LÉDA, P.H. Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Conhecimento tradicional e científico das espécies nativas do Brasil. **REVISE-Revista Integrativa em Inovações Tecnológicas nas Ciências da Saúde**, v. 11, p. 191-209, Jan. 2023.

CECHINEL, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, p. 99-105, Fev. 1998.

CHATTOPADHYAY, D.; THIRUMURUGAN, K. Longevity promoting efficacies of different plant extracts in lower model organisms. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 171, p. 47–57, Mar. 2018. DOI: 10.1016/j.mad.2018.03.002

COCKERILL, F. R. *et al.* **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard—ninth edition. MA07-A9. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A. Food and plant bioactives for reducing cardiometabolic disease: How does the evidence stack up? **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p.

192–202, Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.04.001

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v.261, n.3, p. 201-217, May. 2016. DOI: 10.11646/phytotaxa.261.3.1

COLLINS, C. H. O Desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 5–12, 2010.

CUI, Steve W. (Ed.). **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. CRC press, 2005.

DAGENAIS, G. R.; LEONG, D. P.; RANGARAJAN, S.; LANAS, F.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; GUPTA, R.; DIAZ, R.; AVEZUM, A.; OLIVEIRA, G. B. F.; WIELGOSZ, A.; PARAMBATH, S. R.; MONY, P.; ALHABIB, K. F.; TEMIZHAN, A.; ISMAIL, N.; CHIFAMBA, J.; YEATES, K.; KHATIB, R.; RAHMAN, O.; ZATONSKA, K.; KAZMI, K.; WEI, L.; ZHU, J.; ROSENGREN, A.; VIJAYAKUMAR, K.; KAUR, M.; MOHAN, V.; YUSUFALI, A. H.; KELISHADI, R.; TEO, K. K.; JOSEPH, P.; YUSUF, S. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 785–794, Mar. 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32007-0.

DAS, D.; MAITI, S.; MAITI, T.K.; ISLAM, S.S.. A new arabinoxylan from green leaves of *Litsea glutinosa* (Lauraceae): structural and biological studies. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1243-1248, Feb. 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.052.

DEKA, J.; BORAH, U.; DASH, B.; DASH, S.; KALITA, L. Preliminary Phytochemical Screening and in Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Stem of the Herb *Basella Alba* L. Var *Rubra* (L.) Stewart (Family-Basellaceae). **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 91, Dec. 2017. DOI: 10.22159/ijcpr.2017.v9i3.19599

DENG, R.; WANG, F.; WANG, L.; XIONG, L.; SHEN, X.; SONG, H. Advances in Plant Polysaccharides as Antiaging Agents: Effects and Signaling Mechanisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 71, p. 7175-7191, May. 2023. DOI: 10.1021/acs.jafc.3c00493.

DION C, CHAPPUIS E, RIPOLL C. Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. **Nutrition & Metabolism**, v.12, p.13-28, Apr. 2016. DOI: 10.1186/s12986-016-0086-x.

Discoverly Life. *Anredera*. Disponível em: <https://www.discoverlylife.org/mp/20m?kind=Anredera>. Acesso em 16 out 2023.

DJAMIL, R.; WAHYUDI, P.S.; WAHONO, S.; HANAFLI, M. Antioxidant activity of flavonoid from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis leaves. **International research journal of pharmacy**, v. 3, n. 9, p. 241-243, Sep. 2012.

DJAMIL, R.; WIONARTI, W.; ZAIDAN, S.; ABDILLAH, S. Antidiabetic activity of flavonoid from binahong leaves (*Anredera cordifolia*) extract in alloxan induced

mice. **Journal Pharmacognosy & Natural Product**, v. 3, n. 2, p. 139-142, Sep. 2017. DOI: 10.4172/2472-0992.1000139

DONG, C.X.; HAYASHI, K.; MIZUKOSHI, Y.; LEE, J.B. HAYASHI, T. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.1, n.50, p.245-9, Jan. 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.10.022.

DRIRA, M.; HENTATI, F.; BABICH, O.; SUKHIKH, S.; LARINA, V.; SHARIFIAN, S.; HOMAI, A.; FENDRI, I.; LEMOS, M.F.; FÉLIX, C.; FÉLIX, R.; ABDELKAFI, S. MICHAUD, P. (2021). Bioactive carbohydrate polymers between myth and reality. **Molecules**, v. 26, p. 7068, Nov. 2021. DOI: 10.3390/molecules26237068

DWITTIYANTI, D.; HARAHA, Y.; ELYA, B.; BAHTIAR, A. Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Leaf Extract Modulates Fatty Acids and Amino Acids to Lower Blood Glucose in High-Fat Diet-Induced Diabetes Mellitus Rats. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v.28, Apr. 2021, DOI: 10.1155/2021/8869571.

FERIYANI, F.; MAULANZA, H.; LUBIS, R.R.; BALQIS, U.; DARMAWI, D. Effects of Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) Extracts on the Levels of Malondialdehyde (MDA) in Cataract Goat Lenses. **Scientific World Journal**, v.12, Jun. 2021. DOI: 10.1155/2021/6617292.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, Dec. 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, Aug. 1991. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90372-z.

FIRDAUS, M.N.A.; IFORA, W.K.I. Phytochemical and Anti-Inflammatory Potential of *Anredera cordifolia* (Ten): A Review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v.12, n.2, p.121-125, Mar-Apr. 2022. DOI: 10.22270/jddt.v12i2.5228

GANDHI, Y.; KUMAR, R.; GREWAL, J.; RAWAT, H.; MISHRA, S. K.; KUMAR, V.; SHAKYA, S. K.; JAIN, V.; BABU, G.; SHARMA, P.; SINGH, A.; SINGH, R.; ACHARYA, R. Advances in anti-inflammatory medicinal plants and phytochemicals in the management of arthritis: A comprehensive review. **Food Chemistry Advances**, v. 1, n. June, p. 100085, Aug. 2022. DOI: 10.1016/j.focha.2022.100085.

GARMANAA, A.N.; SUKANDARA, E.Y.; FIDRIANNYA, I. Activity of Several Plant Extracts Against Drug-Sensitive and Drug Resistant Microbes. **Procedia Chemistry**, v.13, p.164-19, Dec. 2014. DOI: 10.1016/j.proche.2014.12.021

GBIF - Global Biodiversity Information Facility. *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/3083508>. Acesso em: 29 outubro 2023.

GHOSH, K.; TAKAHASHI, D.; KOTAKE, T. Plant type II arabinogalactan: Structural features and modification to increase functionality. **Carbohydrate Research**, 529:108828, Jul. 2023. DOI: 10.1016/j.carres.2023.108828.

GUAN, Z. W.; YU, E. Z.; FENG, Q. Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 1–15, Nov. 2021. DOI: 10.3390/molecules26226802

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n.3, p.651-715, Mar. 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3.

GUO, Q.; XIAO, X.; LU, L.; AI, L.; XU, M.; LIU, Y.; GOFF, H. D. Polyphenol–polysaccharide complex: Preparation, characterization, and potential utilization in food and health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 13, p. 59-87, Mar. 2022. DOI: 10.1146/annurev-food-052720-010354

HANAFIAH, O.A.; HANAFIAH, D.S.; DOHUDE, G.A.; SATRIA, D.; LIVITA, L., MOUDY, N.S.; RAHMA, R. Effects of 3% binahong (*Anredera cordifolia*) leaf extract gel on alveolar bone healing in post-extraction tooth socket wound in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **F1000Research**, v.15, n.10, p.923, Sep. 2021.DOI: 10.12688/f1000research.72982.2.

HASHIMOTO, M.; MATSUZAKI, K.; MARUYAMA, K.; SUMIYOSHI, E.; HOSSAIN, S.; WAKATSUKI, H.; KATO, S.; OHNO, M.; TANABE, Y.; KURODA, Y.; YAMAGUCHI, S.; KAJIMA, K.; OHIZUMI, Y.; SHIDO, O. Function cordifolia leaf powder attenuates age-related and glucose levels in healthy elderly Japanese individuals: a possible supplement for brain. **Food & Function**, v.13, p. 7226–7239, Jun. 2022. DOI: 10.1039/D2FO00723A.

HE, M.; MIN, J.; KONG, W.; HE, X.; LI, J.; PENG, B. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74–85, Dec. 2016. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.011.

HE, T. B.; HUANG, Y. P.; HUANG, Y.; WANG, X. J.; HU, J. M.; SHENG, J. Structural elucidation and antioxidant activity of an arabinogalactan from the leaves of *Moringa oleifera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 126-133, Jun. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.110

HORNUNG, P. S.; ÁVILA, S.; APEA-BAH, F. B.; LIU, J.; TEIXEIRA, G. L.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Sustainable Use of *Ilex paraguariensis* Waste in Improving Biodegradable Corn Starch Films' Mechanical, Thermal and Bioactive Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 1696–1709, Mar. 2020. DOI. 10.1007/s10924-020-01723-w.

INABA, M.; MARUYAMA, T.; YOSHIMI, Y.; KOTAKE, T.; MATSUOKA, K.; KOYAMA, T.; TSUMURAYA, Y. L-Fucose-containing arabinogalactan-protein in radish leaves. **Carbohydrate research**, v. 415, p. 1-11, Oct. 2015. DOI: 10.1016/j.carres.2015.07.002

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KIDSLEY, A.K.; ABRAHAM, S.; BELL, J.M.; O'DEA, M.; LAIRD, T.J.; JORDAN, D.; MITCHELL, P.; MCDEVITT, C.A.; TROTT, D.J. Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Isolates From Healthy Pigs in Australia: Results of a Pilot National Survey. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.9, p.1207, Jul. 2018 DOI: 10.3389/fmicb.2018.01207.

KINNUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) No Brasil**: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. 1. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2014.

KISMIATI, S.; WAHYUNI, H.I.; MURYANI, R.; SUNARTI, D.; SUMARSIH, S. Addition of binahong (*Anredera cordifolia*) leaf powder to diets to produce eggs with low cholesterol. **Veterinary World**. v. 13, n. 3, p. 604-608, Mar. 2020. DOI: 10.14202/vetworld.2020.604-608.

KLEIN, D. **Química Orgânica** - Vol. 2, 2ª edição. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016. E-book. ISBN 9788521631910. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521631910/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica dos Alimentos** - Teoria e Aplicações Práticas, 2ª edição. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019. E-book. ISBN 9788527735261. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527735261/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KUMAR, P.O.; OBEROI, H.S.; AZEEZ, S. Basella-an underutilized green leafy vegetable with a potential for functional food development. **Food Reviews International**, v. 38, n. sup1, p. 456-473, Feb. 2021. DOI: 10.1080/87559129.2021.1874410

KUMAR, S; PANDEY, A. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The scientific world journal**, v. 2013, Dec. 2013. DOI: 10.1155/2013/162750

KUSRIANI, H.; SUSILAWATI, E.; NURAFIPAH, L.; NURKHOLIFAH. Antidiabetic Activity of Combination of Binahong (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis), Cherry (*Muntingia calabura* L.) and Brotowali (*Tinospora crispa* L.) Extracts. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.15, n.2, p. 75-80, Apr.-Jun. 2023. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs\_917\_21.

LEITE, G.; PAULA, A.; OLIVEIRA, H. DE; SOUZA, L. DE; RODRIGUES, T., NASCIF, É.; VIEIRA, R.; RICARDO, B.; LEITE, D.C. Unconventional food plants : Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v.5, Jun. 2022. DOI: 10.1016/j.fufo.2022.100124

LELIQIA, N. P. E.; SUKANDAR, E. Y.; FIDRIANNY; I.R.D.A. Antibacterial activities of *Anredera Cordifolia* (Ten.) V. Steenis leaves extracts and fractions. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 12, p. 10-13, Dec. 2017. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i12.21503

LIAO, Y.; LI, Z.; ZHOU, Q.; SHENG, M.; QU, Q.; SHI, Y. Saponin surfactants used in drug delivery systems : A new application for natural medicine components. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, p. 120709, May. 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120709.

MACEDO, P. D. G.; MATOS, S. P. de. **Bioquímica dos Alimentos** - Composição, Reações e Práticas de Conservação. São Paulo: Editora Saraiva, 2015. *E-book*. ISBN 9788536520810. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536520810/>. Acesso em: 11 mar. 2023.

MAEMA, L.P.; POTGIETER, M.J.; SAMIE, A. Ethnobotanical survey of invasive alien plant species used in the treatment of sexually transmitted infections in Waterberg District, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 122, p. 391-400, May. 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.01.012

MARRANZANO, M.; ROSA, R. L.; MALAGUARNERA, M.; PALMERI, R.; TESSITORI, M.; BARBERA, A. C. Polyphenols: Plant Sources and Food Industry Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 35, p. 4125–4130, Nov. 2018. DOI: 10.2174/1381612824666181106091303.

MEDEIROS, P.M.; FIGUEIREDO, K.F.; GONÇALVES, P.H.S.; CAETANO, R.A.; SANTOS, É.M.D.C.; DOS SANTOS, G.M.C.; BARBOSA, D.M. DE PAULA, M. MAPELI AM. Wild plants and the food-medicine continuum-an ethnobotanical survey in Chapada Diamantina (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.17, n.1, p.37, May. 2021. DOI: 10.1186/s13002-021-00463-y.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, May. 1982. DOI: 10.1055/s-2007 971236.

MIGUEL, O. G. **Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica**. [S.l: s.n.], 2003.

MILIÃO, G. L. et al. Unconventional food plantas: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v.5, Jun. 2022. DOI: 10.1016/j.fufo.2022.100124

MU, S.; YANG, W.; HUANG, G. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides. **Chemical and Biological Drug Design**, v. 97, n. 3, p. 628-632. Mar. 2021. DOI: 10.1111/cbdd.13798.

MUVHULAWA, N.; DLUDLA, P.V.; ZIQUBU, K.; MTHEMBU, S.X.H.; MTHIYANE, F.; NKAMBULE, B.B.; MAZIBUKO-MBEJE, S.E. Rutin ameliorates inflammation and improves metabolic function: A comprehensive analysis of scientific literature. **Pharmacological Research**, v. 178. Mar. 2022. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106163

NALIYADHARA, N.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; NAIR, T.; HEGDE, M.; ALQAHTANI, M. S.; ABBAS, M.; SETHI, G.; KUNNUMAKKARA, A. Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health : What has been learnt thus far? **Journal of Functional Foods**, v. 100, p. 105365, Jan. 2023. DOI: 10.1016/j.jff.2022.105365.

NASCIMENTO, G.E. do; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M. A comparative study of mucilage and pulp polysaccharides from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.104, p. 278-83, Apr. 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.055.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; JUNIOR, M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, Mar. 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000100020

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7 ed. Porto Alegre: Artemed, 2019.

NGUYEN, H. T.; HERRMANN, F.; KÖNIG, S.; GOYCOOLEA, F. M.; HENSEL, A. Structural characterization of the carbohydrate and protein part of arabinogalactan protein from *Basella alba* stem and antiadhesive activity of polysaccharides from *B. alba* against *Helicobacter pylori*. **Fitoterapia**, v. 157, n. 105132, Mar. 2022. DOI: 10.1016/j.fitote.2022.105132

NIU, C.; DONG, M.; NIU, Y. Lead toxicity and potential therapeutic effect of plant-derived polyphenols. **Phytomedicine**, v. 114, n. 154789, Mar. 2023. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.

NIU, Y.; LIU, W.; FAN, X.; WEN, D.; WU, D.; WANG, H.; LIU, Z.; LI, B. Beyond cellulose: pharmaceutical potential for bioactive plant polysaccharides in treating disease and gut dysbiosis. **Frontiers in Microbiology**. v.14, May. 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1183130

NUNES, M. G.; ENGEL, M. E.; IMIG, D. O gênero *Anredera* (Basellaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, v. 44, n. 1-2, p. 17-24. 2015.

NUR, M. A. *et al.* Determination of biological activities of malabar spinach (*Basella alba*) fruit extracts and molecular docking against COX-II enzyme. **Heliyon**, v. 9, n. 11, Nov. 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21568

OLAWUYI, I.F.; KIM, S.R.; LEE, W.Y. Application of plant mucilage polysaccharides and their techno-functional properties' modification for fresh produce preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 272, Nov. 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118371.

OLIVEIRA, A. F. de; NASCIMENTO, G. E. do; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C.; CIPRIANI, T. R. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 940-946, Dec. 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.122

PAIM, R. C. S. *et al.* Toxic plants from the perspective of a “Quilombola” community in the Cerrado region of Brazil. **Toxicon**, v. 224, n.107028, Mar. 2023. DOI: 10.1016/j.toxicon.2023.107028

PANYAPHU, K.; ON, T. V.; SIRISA-ARD, P.; SRISA-NGA, P.; CHANSAKAOW, S.; NATHAKARNKITKUL, S. Medicinal Plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and Their Potential Value in the Primary Healthcare of Postpartum Women. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 226–237, May. 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.050

PELLEGRINI, M. O. O. SAKURAGUI, C. M. Flora do Espírito santo: Basellaceae. **Rodriguesia**, v. 68, n. 5, p. 1541–1545, Dec. 2017. DOI: 10.1590/2175-7860201768502

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.8, p. 1115-20, Dec. 2003. DOI: 10.1590/s0074-02762003000800025.

PICCOLELLA, S.; CRESCENTE, G.; CANDELA, L.; PACIFICO, S. Nutraceutical polyphenols: New analytical challenges and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 175, p. 112774, Jul. 2019. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.07.022.

POLESI, R. G.; ROLIM, R.; ZANETTI, C.; SANT'ANNA, V.; BIONDO, E. Agrobiodiversidade e segurança alimentar no Vale do Taquari, RS: Plantas alimentícias não convencionais e frutas nativas. **Revista Científica Rural**, v.19, n.2, 2017.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, Apr. 2005. DOI 10.1021/jf0502698.

RAHAYU, Y. Y. S.; ARAKI, T.; ROSLEINE, D. Factors affecting the use of herbal medicines in the universal health coverage system in Indonesia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, N. 112974, May. 2020. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112974.

RANA, A. C.; GULLIYA, B. Chemistry and pharmacology of flavonoids-a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n. 1, p. 8–20, Jan. 2019. DOI:10.5530/ijper.53.1.3

RANIERI, G. R. **Guia prático de plantas alimentícias não convencionais (PANC)**. São Paulo: Instituto Kairós, 2017. Disponível em: <<https://institutokairos.net/wp-content/uploads/2017/08/Carilha-Guia-Prático-de-PANC-Plantas-Alimenticias-Nao-Convencionais.pdf>>. Acesso em: 20 ago 2020.

RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 365-387, Mar. 2019. DOI: 10.1146/annurev-food-032818-121727.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. 26(9–10):1231–1237, May. 1999. Doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

RIBEIRO, Eliana P. **Química de alimentos**. São Paulo: Editora Blucher, 2007. *E-book*. ISBN 9788521215301. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521215301/>. Acesso em: 11 mar. 2023.

ROMERO, A. L.; FONTANA, Á.; DA SILVA, C. C.; DE SOUZA, M. C.; DE CARVALHO, J. E.; FARIA, E. O.; KATO, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A. Atividade antiproliferativa de *Sloanea garckeana* K. Schum. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1359–1361, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000600016

ROSZKOWSKI, S. Application of Polyphenols and Flavonoids in Oncological Therapy. **Molecules**, v. 28, n. 10, May. 2023. DOI: 10.3390/molecules28104080

RUSDIANA, R.; WIDYAWATI, T.; SARI, D.K.; WIDJAJA, S.S.; PUTRA, D.P. The anti-obesity properties of *Anredera cordifolia* leaf extract in rats fed a high-fat diet through inhibition of adipogenesis. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 10, n. 4, p. 809, Dec. 2023. DOI: 10.5455/javar.2023.j737

SAÉNZ, M.T.; GARCÍA, M.D.; FERNÁNDEZ, M.A. Anti-inflammatory activity and acute toxicity of *Anredera leptostachys*. **Phytomedicine**, v.5, n.3, p.195-8, May. 1998. DOI: 10.1016/S0944-7113(98)80027-5.

SCHNEIDER, V. S.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C.C.  $\beta$ -L-Araf-containing arabinan and glucuronoxylan from guavira fruit pomace. **Carbohydrate research**, v. 481, p. 16-22, Jul. 2019. DOI: 10.1016/j.carres.2019.06.005

SEMWAL, R.; JOSHI, S.K.; SEMWAL, R.B.; SEMWAL, D.K. Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, v.46, p. 119-128, Oct. 2021. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.10.006

SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, p. 201-214, Jan.-Mar. 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15\_078

SHAKHMATOV, E.G.; TOUKACH, P.V.; MICHAILOVA, E.A.; MAKAROVA, E.N. Structural studies of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L. Biological activity of pectins of *A. sibirica*. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 515-524, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.07.037.

SHEIK, A.; KIM, E.; ADEPELLY, U.; ALHAMMADI, M.; SUK, Y. Saudi Journal of Biological Sciences Antioxidant and antiproliferative activity of *Basella alba* against colorectal cancer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 103609, Apr. 2023. DOI: 10.1016/j.sjbs.2023.103609.

SHEN, Shihong.; SHI, L.; FAN, D.; ZHU, C.; JIANG, M.; DONG, Y. Ginsenoside Rg5 nanomedicine composited hydrogel with metabolic regulation and immunomodulation properties for tunneling diabetic wounds therapy. **Chemical Engineering Journal**, p. 143989, Jun. 2023. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143989.

SILVA, R.S.; SILVA, T.S.; SILVA, U.L.T.; COELHO, M.D.G. Bioensaio toxicológico de plantas alimentícias não convencionais em *Artemia salina* Leach. **Revista Ciência e Saúde On-line**, v. 6, n. 3, 2021.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

- SONG, Q.; WANG, Y.; HUANG, L.; SHEN, M.; YU, Y.; YU, Q.; CHEN, Y.; XIE, J. Review of the relationships among polysaccharides, gut microbiota, and human health. **Food Research International**, v. 140, n.109858, Feb. 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109858.
- SOUZA, L.F.; BARROS, I.B.I.; MANCINI, E.; MARTINO, L.; SCANDOLERA, E.; FEO, V. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil from *Anredera cordifolia* Grown in Brazil. **Natural Product Communications**, v.9, n.7, Jul. 2014.
- SOUZA, P.G.; AZEREDO, D.R.; SILVA, T.T.C.; CARNEIRO, C.D.S.; TEODORO, A.J.; AYRES, E.M.M. Food neophobia, risk perception and attitudes associations of Brazilian consumers towards non-conventional edible plants and research on sale promotional strategies. **Food Research International**. v.167, May. 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112628.
- SRITHI, K.; TRISONTHI, C.; WANGPAKAPATTANAWONG, P.; BALSLEV, H. Medicinal plants used in Hmong women's healthcare in northern Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 119–135, Jan. 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.10.028.
- SUMIYOSHI, E.; HASHIMOTO, M.; HOSSAIN, S.; MATSUZAKI, K.; ISLAM, R.; TANABE, Y.; MARUYAMA, K.; KAJIMA, K.; ARAI, H.; OHIZUMI, Y.; SHIDO O. *Anredera cordifolia* extract enhances learning and memory in senescence-accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) mice. **Food Functional**, v.12, n.9, p. 3992-4004, Apr. 2021. DOI: 10.1039/d0fo03272g.
- SUN, Q.; CHENG, L.; ZENG, X.; ZHANG, X.; WU, Z.; WENG, P. The modulatory effect of plant polysaccharides on gut flora and the implication for neurodegenerative diseases from the perspective of the microbiota-gut-brain axis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1484–1492, Dec. 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.208.
- SUTRISNO, E.; ADNUANA, K.; SUKANDAR, E.Y.; FIDRIANNY, I.; ALIGITA, W. Anti-inflammatory study of *Anredera cordifolia* leaves and *Centella asiatica* herbs and its combinations using human red blood cell-membrane stabilization method. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. 78-80, Sep. 2016. DOI: 10.22159/ajpcr.2016.v9i5.11973
- TAIZ, L; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fundamentos de fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Grupo A, 2021. *E-book*. ISBN 9786581335113. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786581335113/>. Acesso em: 12 mar. 2023.
- TAM, V.H.; KABBARA, S.; VO, G.; SCHILLING, A.N.; COYLE, E.A. Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2626-31, Aug. 2006. DOI: 10.1128/AAC.01165-05.
- TAN, X.; ZHOU, X.; CHEN, H.G. Structure-activity relationship of plant polysaccharides. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 42, n. 21, p. 4104-4109, Nov. 2017 DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20170928.016.

TOBAR-DELGADO, E.; MEJÍA-ESPAÑA, D.; OSORIO-MORA, O.; SERNA-COCK, L. Rutin: Family Farming Products' Extraction Sources, Industrial Applications and Current Trends in Biological Activity Protection. **Molecules**, v. 28, Aug. 2023. DOI: 10.3390/molecules28155864

TONGCO, J. V. V; AÑIS, A. D.; TAMAYO, J. P. Nutritional Analysis , Phytochemical Screening , and Total Phenolic Content of Basella alba Leaves from the Philippines. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 5, p. 1031–1033, Sep. 2015.

TSHIKALANGE, T.E.; MEYER, J.J.M.; HUSSEIN, A.A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacogy**, v. 96, n. 3, p. 515-519, Jan. 2005. DOI: 10.1016/j.jep.2004.09.057

UDULUTSCH, R.G., DIAS, P., PINHEIRO, M.H.O.; FURLAN, A. Basellaceae In: Melhem, T.S., Wanderley, M.G.L., Martins, S.E., Jung-Mendaçolli, S.L., Shepherd, G.J., Kirizawa, M. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, vol. 5, p. 17-20, 2007.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216–223, Jun. 2006. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000200015

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. da S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820170653

VÁSQUEZ-REYES, S.; VELÁZQUEZ-VILLEGAS, L. A.; VARGAS-CASTILLO, A.; NORIEGA, L. G.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. Dietary bioactive compounds as modulators of mitochondrial function. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 96, n. 15, p. 1–18, May. 2021. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2021.108768

VIANA, M. M. S.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, M. L. V. Composição fitoquímica e potencial antioxidante de hortaliças não convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 504–509, Dec. 2015. DOI: 10.1590/S0102-053620150000400016

VILLEGAS LF, FERNÁNDEZ ID, MALDONADO H, TORRES R, ZAVALA A, VAISBERG AJ, Hammond GB. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, n.3, p. 193-200. Feb. 1997. DOI: 10.1016/s0378-8741(96)01500-0.

VOS, W. M.; TILG, H.; HUL, M. V.; CANI, P. D. Gut microbiome and health : mechanistic insights. **Gut**, v.71, p. 1020–1032, May. 2022. DOI:10.1136/gutjnl-2021-326789

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WANG, D.; SHA, L.; XU, C.; HUANG, Y.; TANG, C.; XU, T.; LI, X.; DI, D.; LIU, J.; YANG, L. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Natural saponin and cholesterol assembled nanostructures as the promising delivery method for saponin. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 214, p. 112448, Jun. 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112448.

WANG, Q.; YANG, B.; WANG, N.; GU, J. Tumor immunomodulatory effects of polyphenols. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1–13, Nov. 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1041138

WILLETT, W.; ROCKSTRÖM, J.; LOKEN, B.; SPRINGMANN, M.; LANG, T.; VERMEULEN, S.; GARNETT, T.; TILMAN, D.; DECLERCK, F.; WOOD, A.; JONELL, M.; CLARK, M.; GORDON, L. J.; FANZO, J.; HAWKES, C.; ZURAYK, R.; RIVERA, J. A.; DE VRIES, W.; MAJELE SIBANDA, L.; AFSHIN, A.; CHAUDHARY, A.; HERRERO, M.; AGUSTINA, R.; BRANCA, F.; LARTEY, A.; FAN, S.; CRONA, B.; FOX, E.; BIGNET, V.; TROELL, M.; LINDAHL, T.; SINGH, S.; CORNELL, S. E.; SRINATH REDDY, K.; NARAIN, S.; NISHTAR, S.; MURRAY, C. J. L. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. **The Lancet**, v. 393, n. 10170, p. 447–492, Feb. 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.

WILLIAMS, D. J.; EDWARDS, D.; HAMERNIG, I.; JIAN, L.; JAMES, A. P.; JOHNSON, S. K.; TAPSELL, L. C. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. **Food Research International**, v.52, p. 323-333, Mar. 2013. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.03.015

WOLFROM, M.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963b.

WORLD FLORA ONLINE (WFO). **World Flora Online Plant List 2024**. Disponível em: <https://wfoplantlist.org/plant-list/>. Acesso 15 mar 2024.

YAMASSAKI, F. T.; CAMPESTRINI, L. H.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; MAURER, J. B. B. Chemical characterization and complement modulating activities of an arabinogalactan-protein-rich fraction from an aqueous extract of avocado leaves. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 513-521, Aug. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.072

YARLEY, O. P. N.; KOJO, A. B.; ZHOU, C.; YU, X.; GIDEON, A.; KWADWO, H. H.; RICHARD, O. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 2262–2271, Jul. 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.181.

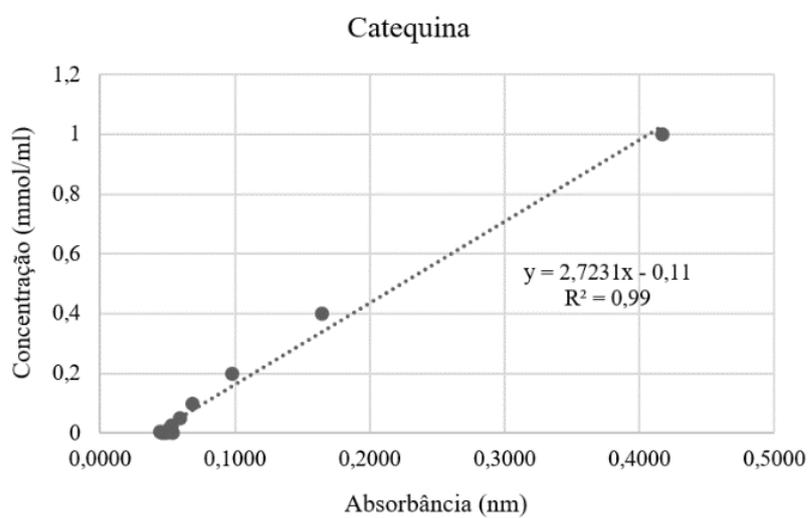
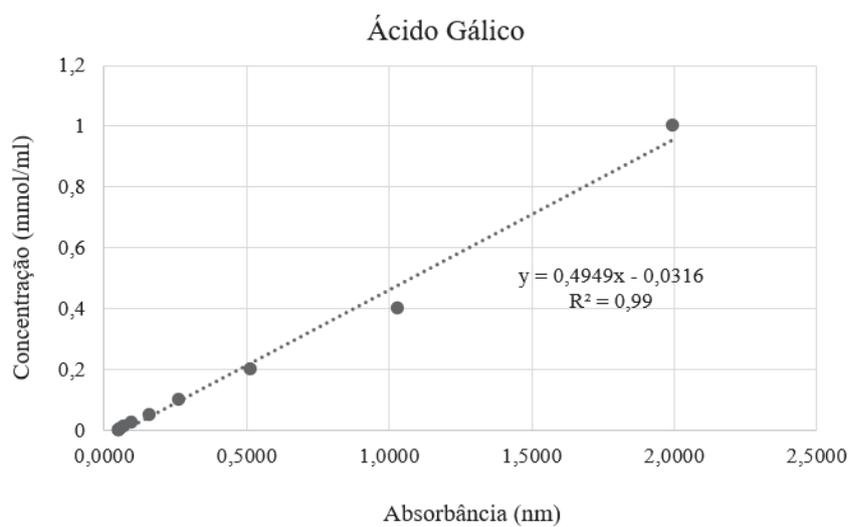
YUNIARTI, N.; YULIZAR, Y. Chitosan Nanoparticles Modified by *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis Leaf Extract for Enhancement of Azithromycin Encapsulation Efficiency and Loading Capacity: In vitro Drug Release Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, Dec. 2023, DOI: 10.1016/j.xphs.2023.07.021.

ZHANG, R.; BELWAL, T.; LI, L.; LIN, X.; XU, Y.; LUO, Z. Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 242, Aug. 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116388

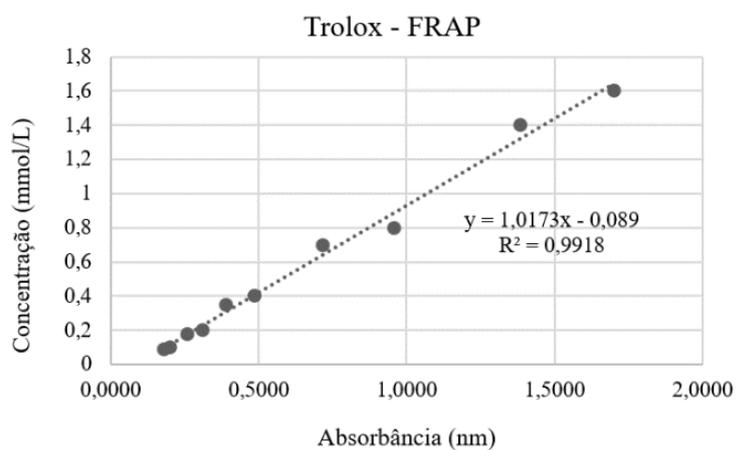
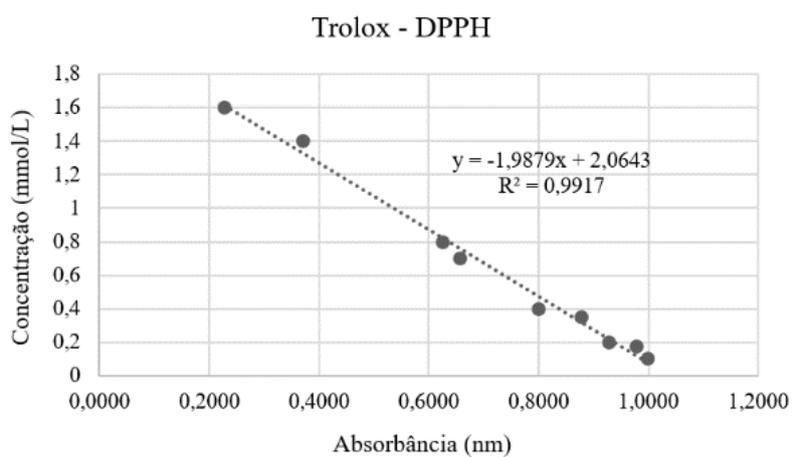
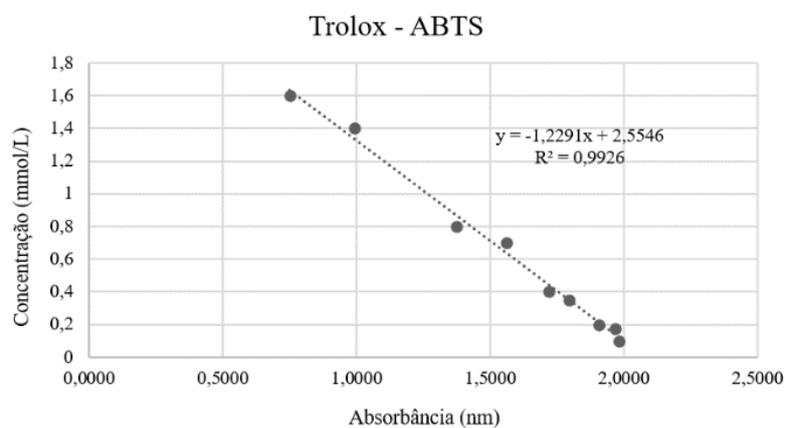
ZHANG, Z.; SHEN, C.; GAO, F.; WEI, H.; REN, D.; LU, J. Isolation, Purification and Structural Characterization of Two Novel Water-Soluble Polysaccharides from *Anredera Cordifolia*. **Molecules**, v. 22, n. 8, Aug. 2017. DOI: 10.3390/molecules22081276.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**. v. 64, n. 4, p. 555-559, Mar. 1999. DOI. 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

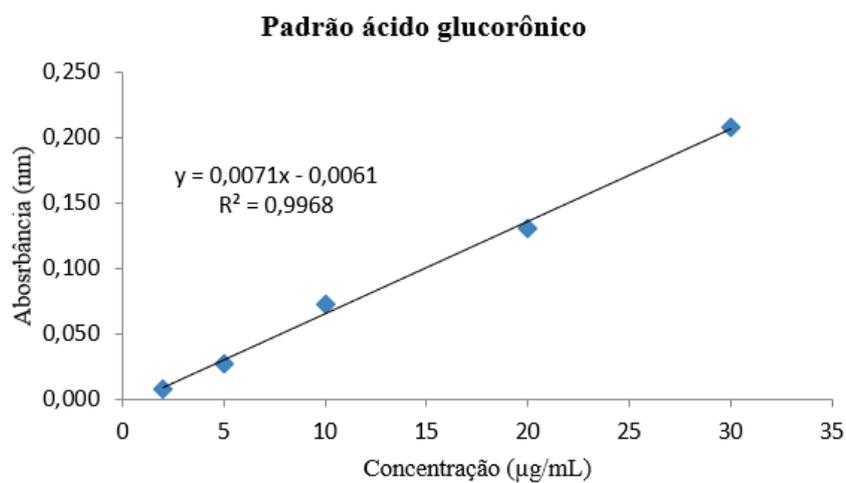
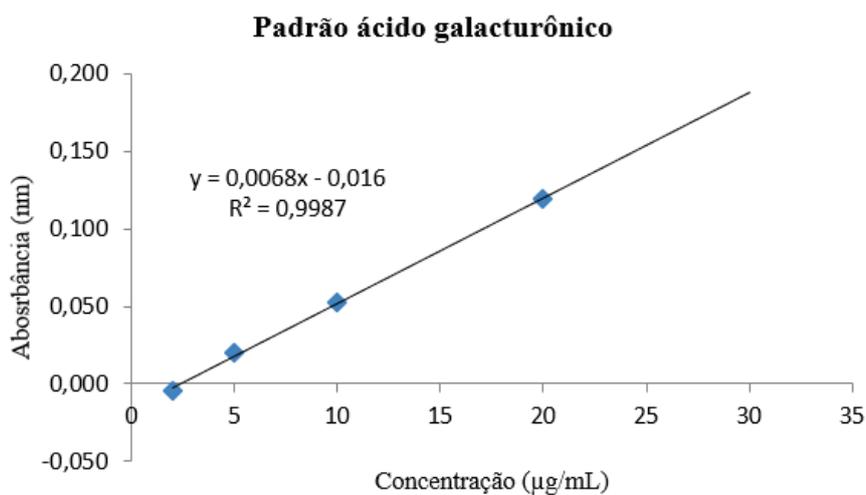
## APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES



## APÊNDICE 2 – CURVAS ANALÍTICAS PARA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE E DOSEAMENTOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES



### APÊNDICE 3 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTOS DE ÁCIDOS URÔNICOS



## ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO SISGEN

  
Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
Cadastro nº AA7DEF6

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGer em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AA7DEF6**  
Usuário: **Universidade Federal do Paraná**  
CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**  
**Anredera tucumanensis**

Título da Atividade: **Caracterização físico-química, estudo fitoquímico, atividades biológicas, toxicidade e polissacarídeos da espécie vegetal Anredera tucumanensis (Lillo & Hauman) Sperling**

**Equipe**

<b>Obdulio Gomes Miguel</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
<b>Lucimara Mach Cortes Cordeiro</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
<b>Marilis Dallarmi Miguel</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
<b>Josiane de Fátima Gaspari Dias</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>

Data do Cadastro: **21/11/2023 09:45:08**  
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:45 de 21/11/2023**.

  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - SISGEN

