

PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE, TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DA *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, UMA PLANTA ALIMENTÍCIA NÃO CONVENCIONAL

Recebido em: 15/01/2025

Aceito em: 01/04/2025

DOI: 10.25110/arqsaud.v29i1.2025-11166



Letícia Mazepa ¹
Cintia Aparecida dos Anjos ²
Idonilton da Conceição Fernandes ³
Paula Piekarski Barchik ⁴
Suelen Ávila ⁵
Josiane de Fátima Gaspari Dias ⁶
Marilis Dallarmi Miguel ⁷
Obdulio Gomes Miguel ⁸

RESUMO: O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial antioxidante, a toxicidade e a atividade antimicrobiana das folhas da *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, uma planta alimentícia não convencional pertencente à família *Basellaceae* e encontrada no Sul do Brasil. A coleta do material vegetal foi realizada na região serrana do Paraná (Município de Morretes) e a identificação no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba. Após separação de folhas e caule, as folhas foram levadas à desidratação em estufa e posteriormente trituradas. Com o material seco foi realizada a extração por maceração e percolação em aparelho Soxhlet, utilizando acetona como solvente extrator. A partir do extrato cetônico foi realizado o fracionamento com solventes de polaridade crescente, obtendo as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. O resíduo da amostra foi extraído com etanol a 96%, sendo obtido o extrato etanólico. Foi avaliada a propriedade antioxidante do extrato cetônico e das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente), bem como do extrato etanólico pelos ensaios ABTS[•], DPPH[•] e FRAP. Foram dosados os fenólicos e os flavonoides totais, e realizadas análises de toxicidade e ação antimicrobiana. O potencial antioxidante e o teor de fenólicos foi estatisticamente maior na fração clorofórmio. As

¹ Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: leticia.mazepa@ufpr.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3329-639X>

² Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: cintia08anjos@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5716-8646>

³ Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná.
E-mail: tonhfernandes@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4728-4488>

⁴ Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: piekarskipaula@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6422-4490>

⁵ Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: suelenavila@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3776-1968>

⁶ Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: jodias@ufpr.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8548-8505>

⁷ Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) pela Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
E-mail: marilisdmiguel@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1126-9211>

⁸ Doutorado em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.
E-mail: obdulio@ufpr.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2231-9130>

amostras estudadas não apresentaram toxicidade pelos testes preliminares da *Artemia salina* e capacidade hemolítica, bem como não exerceram ação antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Com base nos ensaios preliminares conduzidos, foi possível verificar que além da propriedade antioxidante, presença de compostos fenólicos e flavonoides, as folhas da *A. tucumanensis* apresentam baixa toxicidade. Esses dados reforçam a relevância da continuidade de investigações sobre composição a dessa espécie vegetal de forma a identificar seu potencial como alimento funcional e matéria-prima para o desenvolvimento de nutracêuticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Anredera*; *Bassellacea*; *Boussingaultia tucumanensis*; Antioxidantes; Fitoquímicos; Compostos bioativos; Alimentos funcionais; Plantas alimentícias não convencionais.

ANTIOXIDANT PROPERTY, TOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE LEAVES OF *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, AN UNCONVENTIONAL FOOD PLANT

ABSTRACT: The objective of this research was to evaluate the antioxidant potential, toxicity and antimicrobial activity of the leaves of *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, an unconventional food plant belonging to the *Bassellacea* family and found in southern Brazil. The collection of plant material was carried out in the mountainous region of Paraná (Municipality of Morretes) and identification in the Herbarium of the Municipal Botanical Museum of Curitiba. After separating the leaves and stem, the leaves were dehydrated in an oven and subsequently crushed. With the dry material, extraction was carried out by maceration and percolation in a Soxhlet apparatus, using acetone as the extracting solvent. From the ketone extract, fractionation was carried out with solvents of increasing polarity, obtaining the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions. The sample residue was extracted with 96% ethanol, and the ethanolic extract was obtained. The antioxidant property of the ketone extract and fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder), as well as the ethanolic extract, was evaluated using the ABTS[•], DPPH[•] and FRAP assays. Total phenolics and flavonoids were measured, and toxicity and antimicrobial action analyzes were carried out. The antioxidant potential and phenolic content were statistically higher in the chloroform fraction. The samples studied did not present toxicity according to preliminary tests for *Artemia salina* and hemolytic capacity, as well as did not exert antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. Based on the preliminary tests conducted, it was possible to verify that in addition to the antioxidant property, presence of phenolic compounds and flavonoids, the leaves of *A. tucumanensis* have low toxicity. These data reinforce the relevance of continuing investigations into the composition of this plant species in order to identify its potential as a functional food and raw material for the development of nutraceuticals.

KEYWORDS: *Anredera*; *Bassellacea*; *Boussingaultia tucumanensis*; Antioxidants; Phytochemicals; Bioactive compounds; Functional foods; Unconventional food plants.

PROPIEDAD ANTIOXIDANTE, TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS HOJAS DE *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, UNA PLANTA ALIMENTARIA NO CONVENCIONAL

RESUMEN: El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial antioxidante, la toxicidad y la actividad antimicrobiana de las hojas de *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling, una planta alimenticia no convencional perteneciente a la familia *Basellaceae* y encontrada en el sur de Brasil. La recolección del material vegetal se realizó en la región montañosa de Paraná (Municipio de Morretes) y la identificación en el Herbario del Museo Botánico Municipal de Curitiba. Luego de separar las hojas y el tallo, las hojas fueron deshidratadas en un horno y posteriormente Trituradas. Con el material seco, la extracción se realizó mediante maceración y percolación en un aparato Soxhlet, utilizando acetona como disolvente extracto. Del extracto cetónico se realizó el fraccionamiento con solventes de polaridad creciente, obteniéndose las fracciones hexano, cloroformo, acetato de etilo y resto. El residuo de la muestra se extrajo con etanol al 96% y se obtuvo el extracto etanólico. La propiedad antioxidante del extracto cetónico y sus fracciones (hexano, cloroformo, acetato de etilo y resto), así como del extracto etanólico, se evaluó mediante los ensayos ABTS⁺, DPPH⁺ y FRAP. Se midieron los fenólicos y flavonoides totales y se realizaron análisis de toxicidad y acción antimicrobiana. El potencial antioxidante y el contenido fenólico fueron estadísticamente mayores en la fracción de cloroformo. Las muestras estudiadas no presentaron toxicidad según pruebas preliminares para Artemia salina y capacidad hemolítica, así como tampoco ejercieron acción antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Con base en las pruebas preliminares realizadas, se pudo comprobar que además de la propiedad antioxidante, presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, las hojas de *A. tucumanensis* presentan baja toxicidad. Estos datos refuerzan la relevancia de continuar las investigaciones sobre la composición de esta especie vegetal con el fin de identificar su potencial como alimento funcional y materia prima para el desarrollo de nutracéuticos.

PALABRAS CLAVE: *Anredera*; *Bassellaceae*; *Boussingaultia tucumanensis*; Antioxidantes; Fitoquímicos; Compuestos bioactivos; Alimentos funcionales; Plantas alimenticias no convencionales.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país conhecido por sua ampla dimensão e riqueza em recursos naturais. Dentre as espécies nativas estão as plantas alimentícias não convencionais (PANC), vegetais de desenvolvimento espontâneo, comuns em jardins, hortas, quintais e até mesmo em calçadas de rua, mas que normalmente não fazem parte da rotina alimentar da população de um local, região ou país (KINNUPP, 2014; RANIERI, 2017). Muitas PANC brasileiras descritas na literatura despertam o interesse pela composição nutricional, fitoquímica e atividades biológicas (RANIERI, 2017; CARVALHO; CONTE-JUNIOR, 2021; De LIMA SANTOS *et al.*, 2022).

Estudos prévios sobre espécies da família Basellaceae têm demonstrado a presença de uma ampla variedade de metabólitos bioativos, incluindo flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos, terpenoides, carotenoides e fenóis, além de atividades antimicrobiana e antioxidantane (AZAD *et al.*, 2013; TONGCO *et al.*, 2015; ADEGOKE; OJO, 2017; DEKA *et al.*, 2017; RUSDIANA *et al.*, 2024). Dentre as PANC dessa família, *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (*A. cordifolia*) destaca-se por apresentar folhas com um teor de compostos fenólicos de 54 mg GAE/100 g de matéria seca e uma atividade antioxidantane superior a 70% na captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (ALBA; TESSARO; SOBOTTKA, 2022). Além disso, essa espécie demonstrou atividade alelopática, e a presença do composto 3-hidroxi-alfa-ionona foi identificada por Bari *et al.* (2019).

Outra espécie do mesmo gênero, *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling (*A. tucumanensis*), popularmente conhecida como bortalha crocante, é considerada uma hortaliça folhosa rústica e resistente a baixas temperaturas (KINNUPP, 2014). Essa espécie ocorre naturalmente na Argentina, Colômbia, Equador e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. No estado do Paraná, foi identificada em clareiras de florestas preservadas, onde forma ramagens que atingem a copa das árvores (NUNES, ENGEL, IMIG, 2015; PELLEGRINI, SAKURAGUI, 2017). Embora as folhas tenham sido consumidas após cocção e possuam valor ornamental, há uma escassez de informações na literatura sobre a composição química e os benefícios para a saúde (KINNUPP, 2014).

O interesse pelo potencial antioxidantane das plantas está relacionado desde os efeitos benéficos à saúde humana até a aplicação em sistemas alimentares como aditivo (GULCIN, 2020). Quanto à saúde, as ações antioxidantane e anti-inflamatória de compostos 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 antioxidantanes como aditivos naturais em substituição aos sintéticos tem demonstrado eficácia no retardamento 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 atividades biológicas benéficas à saúde, os metabólitos secundários sintetizados por espécies vegetais podem apresentar riscos associados à toxicidade. Inalação, ingestão ou contato com plantas tóxicas podem levar a 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 adequadas para o desenvolvimento de fitoterápicos ou fármacos (PAIM *et al.*, 2023; NIU; DONG; NIU, 2023).

Considerando a vasta biodiversidade nacional e a possibilidade de emprego alimentício e nutracêuticos 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. O objetivo do estudo foi avaliar de forma inédita a propriedade antioxidante, dosar os compostos fenólicos e os flavonoides totais, verificar a atividade tóxica preliminar e antimicrobiana das folhas da *A. tucumanensis*.

2. METODOLOGIA

2.1 Material botânico

A coleta da *A. tucumanensis* foi realizada em janeiro de 2020 na região serrana do Paraná, município de Morretes ($25^{\circ}20'52.0''S$, $48^{\circ}53'06.7''W$). O material botânico foi identificado pelo Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, e o voucher da espécie foi depositado no mesmo local sob o registro MBM386620. Essa pesquisa foi registrada no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradiacional Associado) sob o cadastro AA7DEF6.

2.2 Obtenção dos extratos e frações

As folhas foram selecionadas, secas em estufa a $45^{\circ}C$ e trituradas em moinho de facas e martelo. O material seco foi submetido à extração em Soxhlet modificado (CARVALHO *et al.*, 2009), utilizando acetona como solvente extrator. O processo de extração ocorreu sob refluxo contínuo em manta aquecida a $65^{\circ}C$ por aproximadamente 72 h, e resultou no extrato cetônico. Após aferição do volume, o extrato foi filtrado em papel filtro de 80 g/m^2 e concentrado em um rota-evaporador a $60^{\circ}C$ até atingir cerca de 1/3 do seu volume inicial. O extrato cetônico foi dividido em duas partes, a primeira foi

submetida à secagem em banho-maria a 30°C e a segunda foi utilizada para a obtenção das frações.

As frações foram obtidas em aparelho Soxhlet modificado com emprego da técnica de partição líquido-líquido, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila) (CARVALHO *et al.*, 2009). Cada extração teve uma duração média de 12 h. As frações foram levadas a secura em banho-maria a 30°C e então obtidas as chamadas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. O resíduo remanescente após o processo de partição foi chamado de fração remanescente.

Após obtenção do extrato cetônico, o resíduo seco das folhas foi submetido a uma nova extração em Soxhlet, utilizando etanol como solvente extrator. Passadas 72 h de extração, o extrato foi filtrado em papel filtro de 80 g/m² e seco em banho-maria a 30°C, sendo assim obtido o chamado extrato etanólico. O rendimento dos extratos cetônico e etanólico foi determinado a partir do teor de sólidos e o rendimento das frações foi calculado em relação à quantidade do extrato cetônico utilizado no particionamento.

2.3 Propriedade antioxidante, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais

Para a realização dos testes descritos a seguir os extratos e as frações foram solubilizados em metanol em duas concentrações (1:1 e 10:1, m/v). A propriedade antioxidante foi verificada pelos métodos do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995), captura de radical livre 2,2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) conforme Re *et al.* (1999) e, ensaio de redução do ferro (FRAP) segundo Benzie e Strain (1997). A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), e os flavonoides totais foram analisados conforme Zhishen *et al.* (1999). Os ensaios foram realizados em quintuplicata e adaptados para microplacas de 96 poços seguindo as modificações propostas por Hornung *et al.* (2020). As leituras das absorbâncias foram realizadas nos comprimentos de onda de 540, 690, 570, 690 e 540 nm para DPPH[•], ABTS[•], FRAP, fenólicos totais e flavonoides totais, respectivamente.

Os testes de normalidade e homogeneidade foram analisados pelo programa Action 2.8, seguidos da Análise de Variância (ANOVA). O teste Tukey foi aplicado às amostras que apresentaram diferença estatística menor que 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em μmol de equivalente de Trolox (TE)/100 mg de extrato seco para o potencial antioxidante, mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 mg de extrato seco

para fenólicos totais e, mg de equivalente de catequina (CE)/100 mg de extrato seco para flavonoides.

2.4 Toxicidade preliminar

2.4.1 Potencial hemolítico

A avaliação da atividade hemolítica dos extratos e frações foi realizada seguindo a metodologia de Aslam *et al.* (2011). A suspensão de hemácias de sangue de carneiro desfibrilado (Newprov®, lote 62469) foi preparada em tampão fosfato pH 7,4 e adicionada aos microtubos contendo amostras ou controles, os quais foram previamente solubilizados em solução tampão contendo 5% de metanol. Foram testadas, em quintuplicata, as concentrações 75, 100, 250, 500, 750 µg/mL. Os microtubos foram lentamente homogeneizados e, após incubação em estufa a 37°C por 30 min, foram levados ao banho de gelo por 5 minutos e centrifugados a 3000 rpm. O sobrenadante de cada amostra (100 µL) foi diluído em 900 µL da solução tampão e, 200 µL da solução obtida foram transferidos para microplaca de 96 poços.

A leitura das absorbâncias foi realizada a 576 nm em leitor de microplaca. A rutina foi utilizada como controle anti-hemolítico, a saponina como controle hemolítico e o branco foi constituído pela amostra e solução tampão. Os resultados foram expressos em % hemólise.

2.4.2 Teste de letalidade da *Artemia salina*.

A letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi avaliada segundo metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982). Ovos secos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial sob condições controladas de temperatura (27 a 30°C), pH (8 a 9), aeração contínua e iluminação. Após 48 h de eclosão dos ovos, 10 náuplios de *A. salina* foram transferidos para frascos contendo 5 mL de água do mar artificial e extratos ou frações em diferentes concentrações (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL), previamente diluídos em solução salina com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Como controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina e, o controle negativo foi composto por solução salina com 1% de DMSO. Os frascos foram mantidos abertos, em local limpo e temperatura ambiente por 24 h. Após esse período, foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos. A concentração letal para 50% dos náuplios (CL₅₀) foi determinada pela aplicação do teste Probit com o uso do programa IBM SPSS Statistics 22, considerando

tóxicos os extratos que apresentaram CL₅₀ inferior a 1000 µg/mL O ensaio foi realizado em quadruplicata.

2.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada nas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). 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. A solução mãe dos extratos e frações foi preparada em metanol na concentração de 20 mg/mL. Os inóculos de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* foram preparados em solução salina a 0,85%, ajustadas para o padrão de turbidez na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC/mL), e as suspensões diluídas em concentração de 1:20 ($\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL). Diluições seriadas dos extratos (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 µg/mL) foram preparadas em caldo Mueller Hinton na microplaca e em seguida 10 µL da suspensão bacteriana foram adicionados em cada poço. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico gentamicina em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,390; 0,195; 0,097; 0,04; 0,02 µg/mL), e o controle negativo foi composto por solução metanólica a 1%. As placas foram incubadas por 24 h a 35°C.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento dos extratos e frações

O rendimento do extrato cetônico e do extrato etanólico obtido pelo teor de sólidos foi de 4,15% e 6,64%, respectivamente. O rendimento das frações em relação ao extrato cetônico foi de 73,2% para fração hexano, 11,6% para fração clorofórmio, 0,7% para fração acetato de etila e, 8,7% para fração remanescente.

A acetona é amplamente utilizada como solvente extrator de polifenóis em matriz vegetal. Ela favorece a redução do teor de impurezas no extrato bruto, como ácidos orgânicos, açúcares e proteínas, além de evitar a dificuldade do manuseio de extratos viscosos quando da extração aquosa ou hidroalcóolica, como já relatado por Tshikalange, Meyer e Hussein (2005) ao estudarem as folhas da *A. cordifolia*.

3.2 Propriedade antioxidante, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais

A fração clorofórmio apresentou os maiores valores nos ensaios de ABTS, DPPH, FRAP e TPC, indicando uma elevada concentração de compostos fenólicos e uma forte atividade antioxidante. A fração de acetato de etila e o extrato etanólico também exibiram altos níveis nesses ensaios, enquanto as menores concentrações foram observadas na fração remanescente, no extrato cetônico e na fração hexano. A maior quantidade de flavonoides foi identificada na fração remanescente, seguida pela fração clorofórmio e pelo extrato etanólico (Tabela 1).

Tabela 1: Propriedade antioxidante, teor de fenólicos totais e teor flavonoides dos extratos e frações da folha da espécie vegetal da espécie vegetal *Anredera tucumanensis* (Lillo & Hauman) Sperling.

AMOSTRA	ABTS [•] (μ mol ET/100 mg extrato)	DPPH [•] (μ mol ET/100 mg extrato)	FRAP (μ mol ET /100 mg extrato)	TPC (mg GAE/100 mg extrato)	TFC (mg CE/100 mg extrato)
EC	4,40±0,09 ^d	0,99±0,07 ^d	3,49±0,02 ^e	0,67±0,04 ^f	0,62±0,03 ^c
FH	NA	NA	2,48±0,03 ^f	1,05±0,06 ^e	0,55±0,04 ^c
FC	11,85±0,42 ^a	6,99±0,20 ^a	14,82±0,16 ^a	2,63±0,08 ^a	0,89±0,20 ^b
FA	8,60±0,26 ^b	3,68±0,18 ^b	10,59±0,10 ^b	1,49±0,06 ^c	0,22±0,02 ^d
FR	4,82±0,20 ^d	2,29±0,08 ^c	3,98±0,09 ^d	1,25±0,11 ^d	1,22±0,09 ^a
EE	7,30±0,07 ^c	3,61±0,16 ^b	7,09±0,22 ^c	1,97±0,16 ^b	0,71±0,11 ^{bc}

Nota: EC = extrato cetônico; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio; FA = fração acetato de etila; FR = fração remanescente; EE = extrato etanólico; ABTS[•] = 3-etylbenzotiazolina-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; 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 predominância de compostos fenólicos e flavonoides nas frações clorofórmio, acetato de etila e extrato etanólico pode estar relacionada às diferenças de polaridade dos solventes utilizados na extração. Compostos fenólicos e flavonoides apresentam uma ampla gama de polaridades, dependendo da presença de grupos funcionais hidroxila, glicosídeos e metoxila. Solventes de polaridade intermediária, como clorofórmio e

acetato de etila, são mais eficientes na extração de flavonoides agliconas e compostos fenólicos com solubilidade moderada em solventes orgânicos. O etanol, por sua vez, extraí uma gama mais ampla de compostos fenólicos devido à sua miscibilidade com água, permitindo a extração tanto de compostos polares quanto de intermediários. Por outro lado, solventes menos polares, como hexano, favorecem a extração de compostos lipofílicos, o que explica a baixa presença de fenólicos e flavonoides nessa fração (NAWAZ *et al.*, 2020; ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021; TOMINC *et al.*, 2022).

A atividade antioxidante elevada observada nas frações clorofórmio, acetato de etila e etanólica pode ser atribuída à abundância de compostos fenólicos, que atuam como sequestradores de radicais livres por meio da doação de elétrons ou hidrogênios (BENEVIDES *et al.*, 2023). Os ensaios ABTS e DPPH medem a capacidade dos extratos em neutralizar radicais livres através da transferência de elétrons ou hidrogênios, enquanto o ensaio FRAP avalia a capacidade de redução do ferro férreo (Fe^{3+}) a ferro ferroso (Fe^{2+}), refletindo o potencial redutor dos compostos presentes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; BOROSKI *et al.*, 2015). A forte correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais reforça a importância desses compostos na modulação do estresse oxidativo.

Em contraste, o teor de flavonoides totais foi mais elevado na fração remanescente, possivelmente devido à presença de flavonoides glicosilados, que possuem maior solubilidade em solventes polares residuais. A menor atividade antioxidante dessa fração sugere que a estrutura química dos flavonoides presentes pode influenciar sua eficácia antioxidante, uma vez que a atividade está diretamente relacionada ao número e à posição dos grupos hidroxila na estrutura flavonoídica (HASSANPOUR; DOROUDI, 2023). Os resultados evidenciam que a escolha do solvente na extração influencia significativamente o perfil fitoquímico das frações obtidas e, consequentemente, sua atividade biológica.

Os compostos fenólicos dos extratos e frações da *A. tucumanensis* foram superiores ao teor encontrado nas folhas da *Basella alba* por Adegoke e Ojo (2017). Os autores avaliaram o extrato metanólico da folha, que resultou em 0,33 mg GAE/100 mg de extrato. Já os extratos etanólico e aquoso da folha da *Basella alba* apresentaram compostos fenólicos superiores em estudo feito por Tongco, Anis e Tamayo (2015).

O teor de flavonoides da FR foi superior ao extrato bruto metanólico da folha da *Basella alba* e da *Basella rubra*, sendo 0,93 mg e 0,63 mg CE/100 mg de extrato, respectivamente (ADEGOKE; OJO, 2017). Os extratos etanólicos e aquoso da folha de *Basella alba* apresentaram valores superiores para flavonoides comparados com as amostras apresentadas nesse estudo (TONGCO; ÑANIS; TAMAYO, 2015).

O extrato metanólico das folhas da *Basella alba* obtido por agitação em temperatura ambiente foi testado com intuito de 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 queracetina por grama de extrato e, o segundo, 57,9 µg GAE/g 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).

Da mesma forma que extratos de frutas tropicais brasileiras com alta capacidade antioxidante têm sido recomendados como suplementos alimentares e aplicados no desenvolvimento de produtos cosméticos e nutracêuticos (CARVALHO; CONTE-JUNIOR, 2021), estudos com folhas de plantas nativas como a *A.tucumanensis* possibilitam a identificação de outras fontes de metabólitos primários e secundários de interesse à saúde. Análises adicionais, como a caracterização estrutural dos compostos isolados e a avaliação de suas interações sinérgicas, são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais esses metabólitos secundários, fenólicos e flavonoides, contribuem para a atividade antioxidante.

3.3 Toxicidade preliminar.

3.3.1 Atividade hemolítica

Os extratos e frações da folha da *A. tucumanensis* apresentaram baixo potencial hemolítico, representado por percentuais de hemólise que variaram de 0,31% a 6,47%. A FH na concentração de 500 µg/mL foi a que apresentou a maior atividade hemolítica dentre as amostras analisadas, semelhante à capacidade hemolítica da menor concentração testada para o controle saponina (6,67%).

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 (LEITE *et al.*, 2022).

3.3.2 Teste de letalidade da *Artemia salina*.

Extratos e frações das folhas da *A. tucumanensis* não foram considerados citotóxicos para os náuplios de *A. salina*, uma vez que os valores de CL₅₀ para todas as concentrações analisadas foram superiores à 1000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982). O sulfato de quinidina, utilizado como controle positivo, apresentou CL₅₀ de 53,03 µg/ml. Apesar do teste da *A. salina* ser uma análise preliminar de toxicidade, estudos prévios demonstraram correlação entre os resultados obtidos com esse ensaio e a toxicidade *in vivo* (NTUNGWE *et al.*, 2020).

A ausência de toxicidade dos extratos e frações das folhas da *A. tucumanensis* em *A. salina* pode ser um indicador de segurança do consumo, resultado relevante por se tratar de uma PANC. Além da ingestão como hortaliça, agregar potencial antioxidante aos chás comerciais, por exemplo, pode ser pertinente. Especialmente pela popularidade e facilidade de acesso à bebida, bem como a busca crescente da população por alimentos e bebidas funcionais. Estudo publicado em 2024 verificou que apenas um entre cinco chás comerciais analisados apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•], sendo o produto a base de *Camellia sinensis* (FRANCESCHI *et al.*, 2024).

3.4 Atividade antimicrobiana

A folha da *A. tucumanensis* não demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), uma vez que os extratos e frações

testados apresentaram CIM superior a 1000 µg/mL. Para a gentamicina padrão, as CIM 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; TAM *et al.*, 2006).

Essa atividade biológica foi avaliada pelo fato de outras espécies da mesma família ou gênero da *A. tucumanensis* terem demonstrado ação contra algumas cepas em estudos prévios. Adegoke e Ojo (2017) verificaram atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das folhas de *Basella alba* e *Basella rubra* para *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus niger*. O extrato etanólico das folhas da *A. cordifolia* foi eficaz contra o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (GARMANA; SUKANDARA; FIDRIANNYA; 2014; NASUTION; ARTIKA; SAFARI, 2020).

4. CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro estudo a avaliar as propriedades antioxidantes, o teor de compostos fenólicos e flavonoides, a toxicidade preliminar e a atividade antimicrobiana das folhas da *A. tucumanensis*. Os extratos e frações analisados apresentaram atividade antioxidante, especialmente a fração clorofórmio, que também se destacou pelo teor de compostos fenólicos. Nenhuma amostra apresentou ação antimicrobiana e, a ausência de toxicidade nos testes preliminares reforça o potencial da espécie como alimento funcional.

Novos estudos focados na identificação de compostos bioativos presentes na *A. tucumanensis* e ensaios *in vitro* e *in vivo* das atividades biológicas também serão fundamentais para viabilizar a sua aplicação como matéria-prima de interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica. Além disso, por se tratar de uma PANC regional, pesquisas que esclareçam seus benefícios contribuem para a valorização da sociobiodiversidade.

4.1 Limitações

É necessária a realização de maiores investigações que possam isolar e caracterizar os metabólitos secundários presentes na espécie envolvidos no seu potencial antioxidante, avaliar a atividade antimicrobiana frente à diferentes cepas, bem como realizar outros testes de toxicidade.

4.2 Suporte Financeiro

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) –Código Financeiro 001.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, O. G.; 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, 2017.
- 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, 2013.
- ALAR, O. R; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current research in food science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- 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, 2022.
- ASLAM, F. *et al.* Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS Profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. p. 567–578, 2011.
- AZAD, A. K. *et al.* 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, 2013.
- BARI, I. N. *et al.* Allelopathic Potency and an Active Substance from *Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis. **Plants**, v. 8, n. 5, 2019.
- BENEVIDES, C. M. J. *et al.* Efeito da Germinação e da Desidratação no Valor Nutritivo, Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante de Farinhas de Leguminosas. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 7, p. 3396-3428, 2023.
- 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. 1996.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a 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.

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, 2021.

CARVALHO, J. L. S. *et al.* Termoestabilidade de processos extractivos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009.

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, 2018.

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, 2017.

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, 2023.

DE LIMA SANTOS, A. *et al.* Plantas alimentícias não convencionais: revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v.26, n.3, p.1068-1090, 2022.

DEKA, J. *et al.* 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, 2017.

FRANCESCHI, Marco *et al.* AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CHAS COMERCIALIZADOS. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 28, n. 3, p. 659-671, 2024.

GARMANA, 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, 214.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n.3, p.651-715, 2020.

HASHIMOTO, M. *et al.* Perilla frutescens seed oil combined with Anredera cordifolia leaf powder attenuates age-related cognitive decline by reducing serum triglyceride and glucose levels in healthy elderly Japanese individuals: a possible supplement for brain health. **Food & Function**, v. 13, n. 13, p. 7226-7239, 2022.

HASSANPOUR, S. H.; DOROUDI, A. Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 354, 2023.

HORNUNG, P. S. *et al.* 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, 2020. DOI. 10.1007/s10924-020-01723-w.

KIDSLEY, A.K. *et al.* 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, 2018.

KINNUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) No Brasil**: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. 1. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2014. 768 p.

LEITE, G. *et al.* Unconventional food plants : Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v.5, 2022.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.

NALIYADHARA, N. *et al.* Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health : What has been learnt thus far ? **Journal of Functional Foods**, v. 100, p. 105365, 2023.

NASUTION, N. A.; ARTIKA, I. M.; SAFARI, D. Antibacterial Activity of Leaf Extracts of Anredera cordifolia (Ten.) Steenis and Muntingia calabura L. Against *Streptococcus pneumoniae*. **Current Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2020.

NAWAZ, H. *et al.* Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. e17129, 2020.

NIU, C.; DONG, M.; NIU, Y. Lead toxicity and potential therapeutic effect of plant-derived polyphenols. **Phytomedicine**, v. 114, n. 154789, 2023.

NTUNGWE. N. E. *et al.* Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892-2908, 2020.

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.

PELLEGRINI, M. O. O. SAKURAGUI, C. M. Flora do Espírito santo: Basellaceae. **Rodriguesia**, v. 68, n. 5, p. 1541–1545, 2017.

PESSINI, G. L. *et al.* 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. 1115-1120, 2003.

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, 2005.

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/Cartilha-Guia-Pratico-de-PANC-Plantas-Alimenticias-Nao-Convencionais.pdf>. Acesso em: 20 agosto 2020.

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

RUSDIANA, Rusdiana *et al.* In Vivo Evaluation of Anti-obesity and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Leaf Extract of *Anredera cordifolia* in Rats. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 8, n. 8, 2024.

SHEIK, A. *et al.* 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, 2023.

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.

TAM, V. H. *et al.* Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2626-31, 2006.

TOMINC, G. C. *et al.* otimização de método extrativo para raízes de *Arctium lappa* L. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.26, n.3, p.1019-1032, 2022.

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, 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 Ethnopharmacology** , v. 96, n. 3, p. 515-519, 2005.

VÁSQUEZ-REYES, S. *et al.* Dietary bioactive compounds as modulators of mitochondrial function. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v.96, n. 15, p. 1–18, 2021.

VOS, W. M. *et al.* Gut microbiome and health: mechanistic insights. **Gut**, v. 71, n. 5, p.1020–1032, 2022.

WILLIAMS, D. J. *et al.* Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. **Food Research International**, v.52, p. 323-333. 2013.

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 , 1999.

CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA

Letícia Mazepa: Coleta do material, obtenção dos extratos e frações, realização dos experimentos de laboratório e redação do artigo.

Cintia Aparecida dos Anjos: Realização dos experimentos de laboratório e análise dos dados.

Idonilton da Conceição Fernandes: Análise dos dados e redação do artigo.

Paula Piekarski Barchik: Realização dos experimentos de laboratório e redação do artigo.

Suelen Ávila: Realização dos experimentos de laboratório, análise estatística e redação do artigo.

Josiane de Fátima Gaspari Dias: Orientação, análise dos dados e redação do artigo.

Marilis Dallarmi Miguel: Orientação, análise dos dados e redação do artigo.

Obdulio Gomes Miguel: Orientação, análise dos dados e redação do artigo. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.