



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA  
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



JÉSSICA STADNIKI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
METABÓLITOS ESPECIALIZADOS PRESENTES EM EXTRATOS DO  
TUBÉRCULO DO CARÁ-MOELA (*Dioscorea bulbifera*) - APLICAÇÕES  
POTENCIAIS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PATO BRANCO

2019

JÉSSICA STADNIKI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
METABÓLITOS ESPECIALIZADOS PRESENTES EM EXTRATOS DO  
TUBÉRCULO DO CARÁ-MOELA (*Dioscorea bulbifera*) - APLICAÇÕES  
POTENCIAIS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” - Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sirlei Dias Teixeira.  
Coorientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez

Pato Branco, 2019

S777c

Stadniki, Jéssica.

Caracterização química e da atividade biológica de metabólitos especializados presentes em extratos do tubérculo do cara-moela (*Dioscorea bulbifera*): aplicações potenciais em processos biotecnológicos / Jéssica Stadniki. – 2019.

91 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira

Coorientador: Rodrigo Hinojosa Valdez

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2019.

Bibliografia: f. 69 - 85.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Antioxidantes. 3. Biotecnologia. I. Teixeira, Sirlei Dias, orient. II. Pereira, Edimir Andrade, coorient. III. Valdez, Rodrigo Hinojosa, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Processos Químicos e Bioquímicos



## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 92

### TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

"CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
METABÓLITOS ESPECIALIZADOS PRESENTES EM EXTRATOS DO  
TUBÉRCULO DO CARÁ-MOELA (*Dioscorea bulbifera*) - APLICAÇÕES  
POTENCIAIS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS"

*Jéssica Stadniki*

Esta dissertação foi apresentada às 09 horas do dia 12 de abril de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Biotecnológica – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira  
UTFPR/PB  
Orientadora

Profa. Dra. Kelly Ishida  
(vídeo conferência)  
USP/SP  
Examinadora

Visto da Coordenação

Profa. Dra. Vidiany Queiroz  
UTFPR/PB  
Examinadora

**Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos -  
PPGTP

**O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP**

## RESUMO

STADNIKII, Jéssica. **Caracterização química e da atividade biológica de metabólitos especializados presentes em extratos do tubérculo do cará-moela (*Dioscorea bulbifera*). Aplicações potenciais em processos biotecnológicos.** 2019. 92p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019.

A *Dioscorea bulbifera* é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), de nome popular cará-moela, possui um grande poder nutritivo e inúmeros são os relatos de seu potencial biológico. A fim de avaliar as propriedades biotecnológicas presentes no tubérculo do cará-moela, foram obtidos extratos e, a partir deles realizadas a caracterização química, análises do potencial antioxidante, antimicrobiano e antitumoral. Por meio da extração realizada com diferentes solventes (DB-C: Extrato clorofórmico, DB-A: Extrato de acetato de etila, DB-N: Extrato *n*-butanólico e DB-W: Extrato aquoso) partindo do extrato etanólico 75% (DB-E) foi possível identificar o extrato DB-W como o que obteve o melhor rendimento. Os espectros da análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF), permitiram a observação de bandas características de hidroxilas, sinais sugestivos de compostos aromáticos e da presença de carbonila. Essas absorções no IV-TF são um indicativo da presença de compostos fenólicos. Para a análise de compostos fenólicos totais (CFT) o extrato com melhor rendimento foi o DB-A, e para as análises antioxidantes através dos radicais ABTS e DPPH o DB-E, para FRAP o extrato DB-W. As respostas obtidas na análise antimicrobiana, por meio da técnica de disco difusão, demonstram atividade antimicrobiana para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Por meio do método de microdiluição em caldo, o extrato DB-E obteve resposta frente a *S. aureus* (5.000 ug ml<sup>-1</sup>), DB-C frente a *S. aureus* e *Candida albicans* (10.000 ug ml<sup>-1</sup>), para o extrato DB-N foi observada atividade frente todos os micro-organismos testados (10.000 e 5.000 ug ml<sup>-1</sup>), para DB-A frente a *S. aureus* (10.000 ug ml<sup>-1</sup>), *E. coli* e *C. albicans* (5.000 ug ml<sup>-1</sup>). A ação antimicrobiana foi caracterizada como bacteriostática e fungistática. Quando analisada a atividade antitumoral, através do método

MTT(tetrazólio) observou-se a capacidade de inibir a proliferação das linhagens celulares Raji, K562, Jurkat e HL60 pelos extratos DB-A, DB-C, DB-N, onde observa-se este último com o melhor resultado. Os dados obtidos nesta pesquisa apontam para a existência de compostos de importância científica, microbiológica e industrial no tubérculo da *D. bulbifera*, servindo de base para futuras pesquisas que poderão auxiliar na elucidação do mecanismo de ação das substâncias presentes.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, biotecnologia.

## ABSTRACT

STADNIKII, Jéssica. **Chemical characterization and biological activity of specialized metabolites present in tuber extracts of the yan (*Dioscorea bulbifera*) - Potential applications in biotechnological processes.** 2019. 92p. Dissertation (Master degree in Technology of Chemical and Biochemical Processes) - Postgraduate Program in Technology of Chemical and Biochemical Processes. Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, PR, 2018.

*Dioscorea bulbifera* is an unconventional food plant (UFPs), popularly known as gizzard, has a great nutritional power and countless are the reports of its biological potential. In order to evaluate the biotechnological properties present in the gizzard tuber, extracts and, from them, the chemical characterization, analyzes of antioxidant, antimicrobial and antitumor potential were obtained (DB-C extract chloroformic, DB-A: ethyl acetate extract, DB-N: Extract *n*-butanolic and DB-W: Aqueous extract) from the ethanol extract 75% (DB: E) it was possible to identify the DB-W extract as the one that obtained the best yield. Spectra of the analysis Infrared with Fourier Transform (IV-TF) allowed the observation of bands characteristic of hydroxyls, signals suggestive of aromatic compounds and the presence of carbonyl. These IV-TF absorptions are indicative of phenolic compounds. For the analysis of total phenolic compounds (CFT) the extract with the best yield was the DB-A, and for the antioxidant analyzes through the radicals ABTS and DPPH the DB-E, for FRAP the extract DB-W. The responses obtained in the antimicrobial analysis, by means of disk diffusion technique, demonstrate antimicrobial activity for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* microorganisms. By means of the broth microdilution method, the DB-E extract obtained a response against *S. aureus* (5,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), DB-C against *S. aureus* and *Candida. albicans* (10,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), for the DB-N extract showed activity against all tested microorganisms (10,000 and 5,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), for DB-A against *S. aureus* (10,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), *E. coli* and *C. albicans* (5,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The antimicrobial action was characterized as bacteriostatic and fungistatic. When analyzing the antitumor activity, the ability to inhibit the proliferation of the Raji, K562, Jurkat and HL60 cell lines by extracts DB-A, DB-C, DB-N was observed through the MTT (tetrazolium) method, where it is observed the latter with the best result. The data obtained in this research point to the existence of compounds of scientific, microbiological and industrial importance in the tuber of *D. bulbifera*, serving as the basis for future research that may help in the elucidation of the mechanism of action of the substances present.

**Key words:** Antimicrobial activity, antitumor, antioxidant, biotechnology.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por sempre me acompanhar nesta jornada, concedendo saúde e força nas horas difíceis para concluir esse mestrado.

Aos meus pais, Claudio e Zúfia, por nunca medirem esforços para que eu conseguisse estudar, obrigada! Espero poder ser para meus filhos como vocês são para mim. Agradeço aos meus irmãos Jeferson e Cleide pelo apoio incondicional, carinho e amor. Ao Diego por me acompanhar e ajudar sempre, pela paciência, carinho e compreensão durante minha ausência.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sirlei Dias Teixeira, por acreditar em mim em todos os momentos, pela confiança, apoio, ensinamentos. Sou grata pelo exemplo de profissional e ser humano que és. Aos meus coorientadores Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira e Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez por todas as contribuições e exemplo que são. Agradeço ao professor Vanderlei Aparecido de Lima pelo auxílio e orientações referentes a análise estatística.

Agradeço, aos meus amigos e colegas da UTFPR, Aline Savi, Beatriz, Gabrieli, Rafael, Amanda, Renata, Prisca, Juliana e João e Leticia por todo apoio e ensinamentos durante o mestrado, sem a ajuda de vocês não conseguiria chegar até aqui.

Agradeço à Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Agradeço a UNISEP, pelo apoio para que desenvolvesse este projeto, auxiliando na disponibilização de laboratórios e materiais, bem como no período de dispensa para que pudesse trabalhar no projeto de mestrado.

As professoras Vidianny Queiroz e Kelly Ishida pelas contribuições.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Flores e (B) Folhas do Cará-moela	22
Figura 2 – Tubérculo Cará Moela. Coletas feitas no mês de março de 2018	22
Figura 3 – Reação de oxirredução do radical ABTS	26
Figura 4 – Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico	27
Figura 5 – Redução do complexo $Fe^{3+}$ a $Fe^{2+}$ na presença de um antioxidante genérico	27
Figura 6 – Espectro de IV(TF) do extrato clorofórmico do tubérculo cará-moela (DB-C)	45
Figura 7 – Espectro de IV(TF) do extrato acetato de etila do tubérculo cará-moela (DB-A)	46
Figura 8 - Espectro de IV(TF) do extrato <i>n</i> -butanólico do tubérculo cará-moela (DB-N)	47
Figura 9 - Espectro de IV(TF) do extrato aquoso do tubérculo cará-moela (DB-W)	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos	39
Tabela 2 – Massa em gramas (g) dos extratos particionados a partir do extrato bruto (etanol 75%) do tubérculo de Cará-moela	44
Tabela 3 – Resultados médios e EP obtidos para a análise de CFT (mg EAG g <sup>-1</sup> ) para os extratos de <i>D. bulbifera</i>	49
Tabela 4 – Teste de efeito do modelo MLG para CFT	50
Tabela 5 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo Método DPPH (μmol Trolox g <sup>-1</sup> ) para os extratos de <i>D. bulbifera</i>	51
Tabela 6 – Teste de efeito do modelo MLG Log para DPPH	52
Tabela 7 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo método de FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup> ) para os extratos de <i>D. bulbifera</i>	52
Tabela 8 – Teste de efeito do modelo MLG Log. FRAP	53
Tabela 9 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo Método ABTS (μmol Trolox g <sup>-1</sup> ) para os extratos de <i>D. bulbifera</i>	55
Tabela 10 – Teste de efeito do modelo MLG Log. ABTS	56
Tabela 11 – Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do extrato DB -E testado contra os micro-organismos	58
Tabela 12 – MIC dos extratos que apresentaram atividade, frente aos micro-organismos testados	60
Tabela 13 – Atividade antitumoral de CI <sub>50</sub> para os extratos da <i>D. bulbifera</i>	63

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Porcentagem de Atividade Antioxidante (%AA) .....	36
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DB-E	Extrato etanólico
DB-C	Extrato clorofórmico
DB-A	Extrato acetato de etila
DB-N	Extrato <i>n</i> -butanólico
DB-W	Extrato aquoso
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil, $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil
ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
ATM	Atmosfera
mL	Mililitros
mm	Milímetros
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
cm	Centímetro
HT 29 metastático	Tumor maligno de células epiteliais do cólon humano não metastático
SW620	Tumor maligno de células epiteliais do cólon humano metastático
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl <sub>50</sub>	Menor concentração do extrato composto que inibe 50% de células.
VCR	Vincristina
PANC	Plantas não convencionais
OH	Hidroxila
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
EAG	Equivalentes de ácido gálico
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
ABTS• <sup>+</sup>	Radical ABTS
DMSO	Dimetilsulfóxido
RPMI 1640	Meio de cultura celular humana tanto normais e malignas.
PBS	Tampão fosfato-salino
EP	Erro Padrão

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração fungicida Mínima
BHI	Brain Heart Infusion

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
3.1 Produtos naturais.....	19
3.2 Hortaliças Não convencionais .....	20
3.3 Cará-Moela ( <i>Dioscorea bulbifera</i> ) .....	21
3.3.1 Importância econômica.....	24
3.3.2 Propriedades medicinais.....	24
3.4 Compostos Fenólicos.....	25
3.4.1 Captura do radical ABTS.....	27
3.4.2 Sequestro do radical DPPH.....	27
3.4.3 Método de redução do Ferro.....	28
3.5 Atividade Antimicrobiana .....	28
3.6 Atividade Antitumoral .....	29
3.6.1 Método colorimétrico MTT .....	30
3.6.2 Linhagens celulares .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 Caracterização fitoquímica.....	34
4.1.1 Coleta e identificação do material botânico.....	34
4.1.2 Preparo do material vegetal.....	34
4.1.3 Obtenção dos extratos.....	34
4.1.3.1 Extrato etanólico 75%.....	34
4.1.3.2 Partição.....	35
4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	35
4.2 Atividade antioxidante.....	35
4.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	35
4.2.2 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH.....	36

4.2.3	Análise da Atividade Antioxidante pelo método de Captura do ABTS•+ ..	37
4.2.4	Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP .....	38
<b>4.3</b>	<b>Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos .....</b>	<b>38</b>
4.3.1	Disco Difusão .....	39
4.3.2	Microdiluição em caldo .....	40
4.3.3	Concentração Bactericida Mínima e Fungicida Mínima .....	41
<b>4.4</b>	<b>Atividade Antitumoral .....</b>	<b>41</b>
4.4.1	Linhagem celular .....	41
4.4.2	Ensaio colorimétrico MTT( tetrazólio) .....	42
<b>4.5</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Extração .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>Compostos Fenólicos Totais .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade Antioxidante.....</b>	<b>50</b>
5.4.1	Atividade antioxidante DPPH .....	50
5.4.2	Atividade antioxidante FRAP .....	52
5.4.3	Atividade antioxidante ABTS .....	54
5.4.4	Correlação entre Capacidade Antioxidante e Conteúdo Fenólico Total ..	56
<b>5.5</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>57</b>
5.5.1	Atividade antimicrobiana por disco difusão .....	57
5.5.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	60
5.5.3	Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungistática Mínima (CFM)	
	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>5.6</b>	<b>Análise antitumoral .....</b>	<b>63</b>
5.6.1	Efeitos dos extratos de D. bulbifera sobre o crescimento de linhagens celulares de leucemia.....	63
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há séculos as plantas são utilizadas como alicerce da medicina popular tradicional, servindo como base para formulação de medicamentos. Por esta razão, diversos são os estudos etnofarmacológicos que possuem como ponto de partida o conhecimento baseado na experiência, transmitido entre culturas para a busca de novas moléculas bioativas, com base nos relatos populares de sua forma de utilização (FERREIRA et al., 2017).

Historicamente as plantas medicinais demonstraram seu prestígio como fontes de novas moléculas ativas, com potencial terapêutico. Hoje estima-se que 80-85% da população global utilize medicamentos à base de plantas ou de seus princípios ativos, para tratamentos empíricos de doenças diversas. Desta maneira, a medicina tradicional é uma fonte para a indústria farmacêutica na obtenção de novas biomoléculas, bem como de tecnologias para aperfeiçoar tratamentos já existentes (PRAKASH; KUMAR; KUMAR, 2013; ATANASOV et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais ou preparações destas com a finalidade de promover a saúde, reabilitando e curando patologias, todavia, esta entidade relata a necessidade de estudos dessas plantas para garantir a segurança aos usuários, em relação as suas propriedades farmacológicas, toxicológicas e de eficácia (SOUZA et al., 2017).

As hortaliças não convencionais constituem um grupo de plantas pouco exploradas cientificamente. Observada sua utilização doméstica, a partir de culturas transmitidas entre gerações e ainda restritas a determinadas regiões e costumes, em alguns casos, seus benefícios são pouco difundidos e utilizados (CANDIDO et al., 2017).

Neste cenário, algumas espécies de plantas têm sido utilizadas no tratamento de diferentes doenças. Um exemplo é o tubérculo conhecido como cará-moela, utilizado como remédio popular para conjuntivite, diarreia, disenterias sanguinolentas e infecções de pele. Além da utilização popular contra câncer, há relatos de pesquisas científicas *in vitro* com resultados positivos para inibição da replicação do vírus HIV (SHARMA et al., 2017).

Além de muito utilizado pelas suas propriedades medicinais (KUETE et al., 2012) e apresentar demonstrações de avanços quanto à atividade farmacológica (LIU et al., 2010), o cará-moela é utilizado como alimento, com baixo custo comercial agregado e com alto valor nutricional, representado principalmente pela sua alta concentração de amido (MACHADO et al., 2016).

Este tubérculo é uma planta de fácil cultivo, não requer cuidados específicos para seu desenvolvimento, nem a aplicação de defensivos agrícolas (JIMÉNEZ-MONTERO; MARTÍNEZ, 2016). Pertencente ao gênero *Dioscorea*, família *Discoraceae*, é uma espécie de trepadeira que pode chegar a atingir seis metros de altura, com a produção de tubérculos aéreos. É vastamente distribuído em regiões de clima temperado (LIU et al., 2010), sendo encontrado na África tropical, Austrália do Norte, subcontinente indiano, Flórida nos Estados Unidos, China, Camboja, Tailândia, Malásia e Laos (GUAN et al., 2017), motivo pelo qual ainda existem dúvidas sobre sua origem (CASTRO et al., 2012).

Estudos de membros da família *Discoraceae* revelam grandes quantidades de substâncias biologicamente ativas, tais como: polifenóis, saponinas (JAYACHANDRAN et al., 2016), flavonoides e alcaloides (KAYODE et al., 2017).

Em virtude da busca por novas moléculas naturais bioativas com potencial farmacológico, propõem-se a caracterização fitoquímica do cará-moela, avaliando os seus constituintes fenólicos, atividade antioxidante, além do estudo das atividades biológicas contra micro-organismos e atividade antitumoral *in vitro*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a extração com solventes em gradiente crescente de polaridade, do tubérculo do cará-moela (*Dioscorea bulbifera*), a fim de verificar o teor de fenólicos e as potenciais atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral, visando contribuir para o conhecimento e bioprospecção de potenciais aplicações de metabólitos presentes nos extratos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos do tubérculo do cará-moela (*D. bulbifera*), utilizando-se de partição sucessiva com solventes de diferentes polaridades;
- Caracterizar os extratos obtidos por meio da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF);
- Quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar/quantificar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos pelos métodos de sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e poder redutor do íon férrico– FRAP;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos pelo método de disco difusão e microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* dos extratos pelo método MTT frente as linhagens celulares Raji, Jurkat, HL60, K562.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Produtos Naturais

O Brasil é um país reconhecido por ser detentor da maior diversidade biológica do planeta, com um número superior a 350 mil espécies catalogadas, o que representa apenas uma fração da variedade presente na flora do nosso país, que possui 1,8 milhão de espécies, número justificado em função de suas características climáticas (ARAUJO et al., 2015) e extensão territorial. Estes valores demonstram como é pouco conhecida esta variedade (SOUSA et al., 2017).

A biodiversidade pode ser entendida como a variabilidade de organismos vivos provindos de inúmeras origens, incluindo ecossistemas terrestres, marinhos, aquáticos, complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo, ainda, a diversidade dentro de espécies, entre espécies e ecossistemas (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

A utilização de fármacos a base de princípios ativos vegetais, caminha junto à humanidade desde o surgimento do homem. Sua utilização como remédios é uma conduta difundida na medicina popular, entre diversos povos, sendo seu uso baseado no conhecimento tradicional, transmitido oralmente entre gerações (BAVELONI et al., 2017). Acredita-se que o homem utilizava os princípios ativos de plantas por meio de observações e experimentos para curar suas doenças. Com o surgimento da escrita, este conhecimento passou a ser guardado na forma descrita.

A química de produtos naturais vem sendo utilizada há alguns anos como subsídio para diversos segmentos industriais, sejam eles farmacológicos, cosméticos, de fragrâncias ou alimentares, devido à variedade de moléculas e grupos funcionais que fazem parte da biodiversidade (BOLZANI, 2016).

Em função do grande potencial medicinal oferecido pelas plantas, vale destacar a atividade pronunciada dos seus extratos, que apresentam diversas substâncias químicas em sua composição, as quais agem em sinergismo, resultando muitas vezes em ações mais potentes do que quando seus metabólitos são aplicados isoladamente (CASANOVA; COSTA, 2017).

O uso indiscriminado e a falta de conhecimento científico a respeito de muitas plantas, gera uma atmosfera de insegurança, especialmente quanto a seus efeitos tóxicos e a falta de garantia de suas propriedades terapêuticas (SOUZA, 2015). Desta maneira, a inclusão do conhecimento científico ao senso comum, constitui-se como uma alternativa de melhora para o uso de fitocomponentes como agentes medicamentosos, com aumento da segurança, qualidade e eficácia de tratamento (CONDE et al., 2015).

### 3.2 Hortaliças Não Convencionais

As hortaliças não convencionais são espécies vegetais de distribuição limitada, pertencentes à cultura popular de determinados locais e regiões. Estes vegetais tiveram seu consumo prejudicado com o passar dos anos devido a inúmeros fatores, como a mudança de hábitos alimentares, estimulados pelo consumo cada vez maior de produtos industrializados (VIANA et al., 2015), pela competição no mercado com as hortaliças convencionais, baixa disponibilidade no mercado e comercialização (BIONDO et al., 2018).

Estas, muitas vezes de crescimento rústico, não exigem cuidados rigorosos em seu cultivo, além de serem mais resistentes a pragas e doenças (QUEIROZ et al., 2015). Possuem diversas propriedades nutricionais e são de fácil preparo, podendo ser consumidas nas mais variadas formas, caracterizando-se assim, como uma fonte alternativa de alimento, levando-se em consideração o valor nutritivo (ROCHA et al., 2009; ALMEIDA, FERREIRA, DUARTE, 2012).

Em relação ao valor nutricional, as hortaliças não convencionais quando comparadas as suas espécies “aparentadas”, incluem um valor nutricional elevado, com grande quantidade de nutrientes, dentre eles vitaminas, antioxidantes, compostos fenólicos, carotenoides, minerais, lipídeos, proteínas e fibras (BIONDO et al., 2018).

Dentre os exemplos de hortaliças não convencionais pode ser mencionado o cará (*Dioscoreae spp.*); ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*); araruta (*Maranta arundinaceaea*); jacatupé (*Pachirrhizus tuberosus*); mangarito (*Xanthossoma maffaffa*) e o taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), dentre outras.

Estas hortaliças possuem alto valor nutricional, cada qual com suas peculiaridades, todavia, ainda com poucos estudos técnico-científicos (BRASIL, 2010).

### 3.3 Cará-Moela (*Dioscorea bulbifera*)

São conhecidos mais de 09 gêneros da família Dioscoreaceae e 900 espécies (PEDRALLI, 2002), os quais são encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo o planeta (SOUZA et al., 2011). O gênero *Dioscorea* é o maior representante, possuindo o maior número de espécies (FERREIRA et al., 2010), além de apresentar o maior valor econômico agregado, considerando sua utilização medicinal e nutricional (PEDRALLI, 2002).

Este gênero é constituído por plantas vastamente distribuídas por regiões de clima temperado (LIU et al., 2010), podendo ser encontradas na África tropical, Austrália do Norte, subcontinente indiano, Flórida nos Estados Unidos, China, Camboja, Tailândia, Malásia e Laos (GUAN et al., 2017). Por ser encontrada em diversos locais, pairam dúvidas sobre sua real origem (CASTRO et al., 2012). Esta planta é muito utilizada devido as suas propriedades medicinais para tratamentos das mais variadas morbidades (KUETE et al., 2012), e vem demonstrando resultados promissores para estudos etnofarmacológicos (LIU et al., 2010).

A *Dioscorea bulbifera* é caracterizada por ser uma planta trepadeira herbácea, que pode chegar a atingir seis metros de altura, com a produção de tubérculos aéreos e vinhas que se enrolam em sentido anti-horário (JIMÉNEZ-MONTERO; MARTÍNEZ, 2016).

As folhas podem apresentar uma grande diversidade morfológica, com diferentes formas, tamanhos e cores. No caso da *D. bulbifera*, as folhas são simples, apresentam formato de coração ou seta, pecioladas ou não e usualmente alternadas, podendo variar na mesma planta, opostas ou espiraladas, lobadas ou não, com margens lisas, ápice pontiagudo e coloração verde (GONZÁLEZ-VEGA, 2012; SILVA, 2013).

As plantas do gênero *Dioscorea* são dióicas, ocasionalmente nascendo inflorescências femininas e masculinas na mesma planta. A flor feminina,

constituída na forma de espiga, tricarpelar, trilocular, com ovário baixo e geralmente com muitos óvulos, é maior que a masculina. Já as masculinas são encontradas na forma de panículas presentes na parte axilar da folha e possuem odor adocicado e grãos de pólen com alta adesão à antera.



**Figura 1: (A) Flores e (B) folhas do Cará-moela. Fonte: A autoria própria.**

A propagação é feita através dos tubérculos ou sementes. O fruto desta espécie é oblongo, constituído por duas sementes que estão na face inferior. Seus túberos aéreos auxiliam na distinção desta espécie com as demais da família (GONZÁLEZ-VEGA, 2012; SILVA, 2013).



**Figura 2: Tubérculo Cará Moela. Coletas feitas no mês de março de 2018. Fonte: A autoria própria.**

A forma de seus frutos é o que origina os nomes populares dados a esta planta. Dentre eles podem ser citados cará-moela, cará-fígado, cará do ar, cará paquera e cará preto (BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010).

### 3.3.1 Importância Econômica

Constituindo-se como produto alimentar, o cará vem assumindo uma nova dimensão no âmbito da agricultura, deixando de lado a característica de hortaliça não convencional, utilizada como forma de subsistência e tornando-se uma cultura de importância socioeconômica (SILVA, 2013; JIMÉNEZ-MONTERO; MARTÍNEZ, 2016).

A exploração do cará-moela não recebe inúmeros subsídios como outras culturas nobres, ficando à margem de apoio técnico e financeiro, que são fornecidos a culturas exportáveis. A região nordeste do Brasil é responsável pela maior parte da produção nacional, representando 90% do todo (MESQUITA, 2002).

Com a possibilidade de duas colheitas por ano (julho/agosto cará imaturo ou novembro/dezembro cará maduro), a cultura do inhame está caracterizando-se como mais uma fonte de renda para a agricultura familiar (SANTOS, 1996). A cultura ainda movimentava a economia gerando empregos indiretos, ao estar ligada a outros setores como os de armazenagem, transporte e venda, constituindo-se assim como uma fonte que movimentava a economia, promovendo o desenvolvimento das regiões brasileiras onde o consumo desta planta é comum (SANTOS; MACEDO, 2002).

### 3.3.2 Propriedades medicinais

A *D. bulbifera* é detentora de diversas propriedades biológicas, justificadas pelos metabólitos especializados presentes em sua composição, que garantem sua importância na indústria farmacêutica (ADEOSUN et al., 2016; JAYACHANDRAN et al., 2016; KAYODE et al., 2017).

São relatadas uma grande variedade de atividades medicinais, fazendo parte de usos populares, como por exemplo, na medicina chinesa tradicional onde há milhares de anos tem sido utilizada no tratamento de tumores (TAPONDJOU, 2013).

Dentre os relatos de suas ações medicinais são mencionados o uso contra dores de garganta na medicina popular (GHOSH et al., 2012) hanseníase

(WANG et al., 2012). Além de diversos achados farmacológicos contra asma, leishmaniose, flatulências, ação purgativa, anti-helmíntica e ainda usos em distúrbios hematológicos, hemorróidas. Tem sido destacado também, como afrodisíaco e rejuvenescedor (SUBASINI et al., 2015).

Já possui ações relatadas frente a estudos científicos, como a ação hipoglicêmica para tratamento de diabetes, antitumoral para linhagens epidérmicas de ratos (WANG et al., 2012), contra câncer cervical (CUI et al., 2016), através da linhagem de células S180 (tumor de sarcoma); atividades antibacterianas (GHOSH et al., 2012; WANG et al., 2012). Ainda, estudos demonstram o poder na inibição da replicação do vírus HIV-1IN por meio da inibição da enzima integrase, testado através de técnica de ancoragem molecular (CHANIAD et al., 2016).

A família Dioscoreaceae, possui em sua composição uma vasta gama de compostos especializados, sendo estes os responsáveis pelas atividades, valores econômicos e culturais relatados. Dentre eles podem ser citados os polifenóis como os ácidos orgânicos, saponinas, (JAYACHANDRAN et al., 2016) flavonoides, alcaloides (KAYODE et al., 2017), taninos, terpenoides e glicosídeos cardíacos (ADEOSUN et al., 2016).

Esses metabólitos especializados citados acima, também podem estar envolvidos no desenvolvimento de uma atividade biológica muito importante, discutida e estudada nos dias atuais – a atividade antioxidante. Os antioxidantes sintéticos podem estar relacionados com alterações de saúde, como por exemplo, o efeito prejudicial a enzimas hepáticas, causando edema hepático e podendo provocar até mesmo carcinogênese (ZHANG et al., 2010). Estes relatos fundamentam a busca por componentes antioxidantes naturais derivados de plantas, em vista de sua segurança e potencial terapêutico, desde que realizados estudos etnofarmacológicos. Tanto plantas medicinais como resíduos agrícolas, são vistos como fonte potencial de recuperação de fitoquímicos, que podem vir a ser utilizados tanto pela indústria de alimentos quanto de medicamentos e cosméticos (CASTRO-LOPÉZ et al., 2017).

Já foram descritos inúmeros métodos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias ou alimentos, tendo como ponto em comum, a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida de sua capacidade antioxidante no final. Os métodos de determinação

da capacidade antioxidante podem ser apontados de duas maneiras: com base na captura de radicais livres e na determinação da oxidação de uma molécula alvo. Pelo alto número de técnicas que podem ser utilizadas e interferências que podem vir a ocorrer durante o processo, recomenda-se hoje que sejam utilizadas ao menos duas técnicas na busca por um resultado o mais próximo possível da real capacidade antioxidante da amostra (CASTRO-LOPÉZ et al., 2017).

### **3.4 Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos encontram-se presentes em uma vasta quantidade de plantas, contribuindo com mecanismos de defesa destas (ANDRADE, TAVARES, DO NASCIMENTO, 2017). Estes podem ser encontrados de diferentes formas, como fenóis simples, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e ácidos fenólicos (NACZK et al., 2004).

Os compostos fenólicos, dentre as substâncias antioxidantes naturais, chamam a atenção pela ação contra a peroxidação lipídica capaz de produzir desequilíbrio homeostático, promovendo potencial dano oxidativo contra células e tecidos (SOARES, 2002).

Para a quantificação dos compostos fenólicos, o método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin Ciocalteu, baseia-se na interação entre substâncias com possível potencial redutor e o reagente, que originalmente possuem coloração amarela. Em meio a um pH alcalino as substâncias redutoras, como as fenólicas, dissociam um próton, levando à formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu formando óxidos de coloração azul (tungstênio e óxido de molibdênio). Esta coloração é detectável na banda do espectro de 760 nm, possibilitando a quantificação destes compostos por meio da espectrofotometria. Desta maneira, a coloração final da reação será tanto mais azul quanto maior a quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas (PIRES et al., 2017).

### 3.4.1 Captura do radical ABTS

Para realizar a quantificação de compostos antioxidantes, segundo RE et al. (1999), a metodologia de captura do ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), que consiste na reação de redução do radical ABTS pelo persulfato de potássio, demonstra a capacidade da substância antioxidante de estabilizar o radical cátion ABTS presente na solução, que retorna a forma de composto neutro ABTS, conforme representado na Figura 3. A visualização se dá através da mudança de coloração da solução, de verde escura, para tons mais claros a medida que o ABTS vai sendo convertido a sua forma neutra, promovendo diminuição da absorbância em 734nm. A absorbância medida após a reação é comparada à capacidade de um antioxidante sintético padrão, o Trolox, expressando-se o resultado em atividade antioxidante equivalente ao Trolox por grama (do inglês, TEAC  $\text{g}^{-1}$ ).

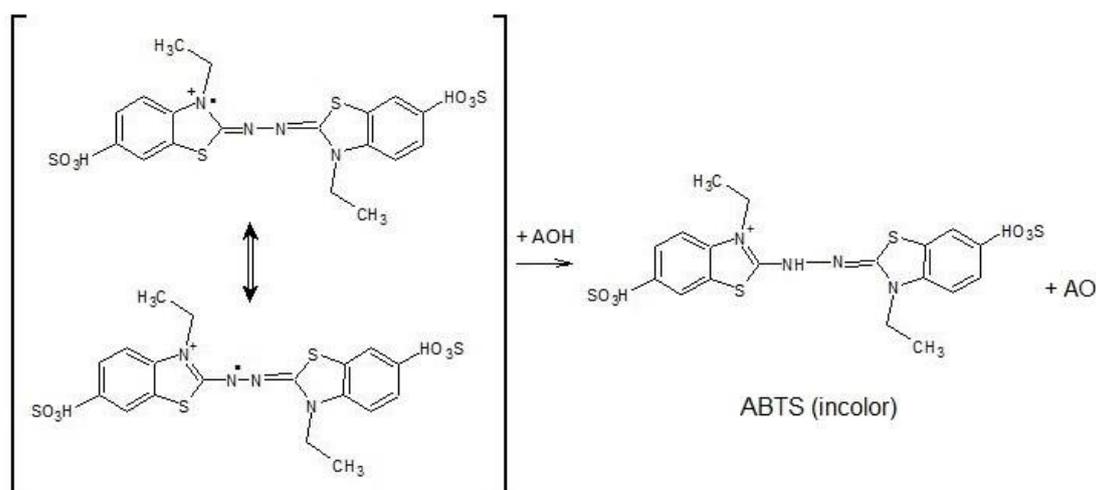
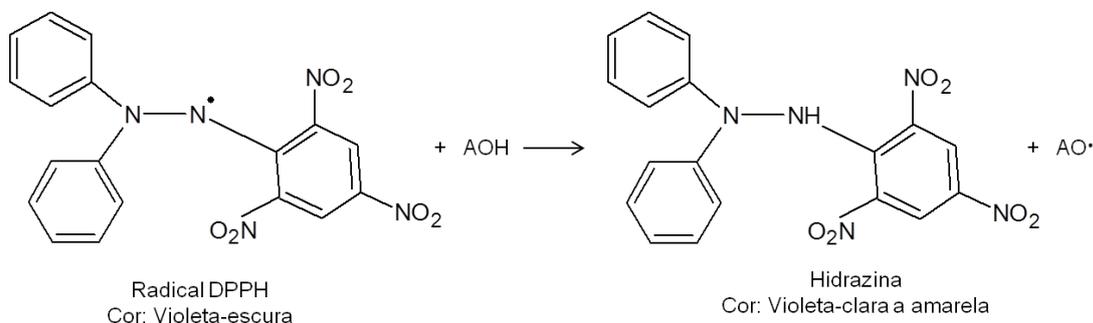


Figura 3 - Reação de oxirredução do radical ABTS. Fonte: SAVI (2018).

### 3.4.2 Sequestro do radical DPPH

O método de sequestro do radical DPPH, utiliza uma molécula (DPPH 1,1-difenil-2-picrilhidrazil,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil) radicalar de nitrogênio orgânico, de coloração violeta, com absorção máxima na faixa de 515-520 nm a qual é caracterizada como um radical livre estável em solução e, à medida que uma substância com capacidade antioxidante sequestra o radical DPPH, reduzindo-o a hidralazina, ocorre mudança na coloração, do violeta ao amarelado, o que é

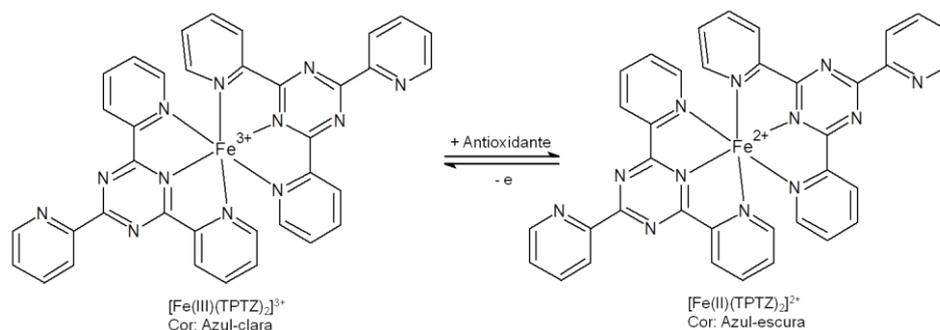
proporcional à capacidade antioxidante da substância conforme representado na figura 4 (SOUZA-SEVALHO; ROCHA; 2017).



**Figura 4: Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico**  
Fonte: SAVI (2018).

### 3.4.3 Método de redução do Ferro

Segundo BENZIE e STRAIN (1996), o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se trata da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta reação se dá na presença de 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, ocorrendo a formação de um complexo corado, que representa a redução do complexo férrico-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}\text{TPTZ}$ ) ao complexo ferroso ( $\text{Fe}^{2+}\text{TPTZ}$ ) na presença de um antioxidante, conforme apresentado na Figura 5 (RUFINO et al., 2006). Os resultados de absorvância, medidos a 593 nm, obtidos a partir da reação entre a amostra analisada e o radical FRAP, são comparados a uma solução que contém íons ferrosos em concentrações conhecidas.



**Figura 5: Redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de um antioxidante genérico.**  
Fonte: Adaptado RUFINO et al. (2006).

### 3.5 Atividade Antimicrobiana

As plantas representam uma riquíssima fonte de moléculas com potencial antimicrobiano e/ou compostos que atuam em sinergismo, potencializando efeitos de outros fármacos utilizados com esta finalidade (GONÇALVES et al., 2011).

Diante do aumento da resistência a antimicrobianos (ALÓS, 2015), cada vez mais buscam-se novos compostos, capazes de realizar a proteção contra infecções provindas de micro-organismos que, com o passar dos anos, vêm desenvolvendo resistência e adaptando-se a terapias antimicrobianas existentes. Por essa razão, justificam-se os estudos fitoquímicos e de farmacognosia das plantas com esta finalidade (REIS; FORTUNA, 2016).

A capacidade antimicrobiana determina a sensibilidade de um micro-organismo frente a determinadas concentrações de um agente (JORGE, 1997). Este teste tem a finalidade de avaliar ações microbicidas ou microbiostáticas sobre micro-organismos. Os antimicrobianos com ação microbicida eliminam o micro-organismo diretamente, enquanto que os de ação microbiostática, impedem o crescimento e proliferação do micro-organismo por determinado período de tempo (TORTORA, FUNKE; CASE, 2005).

Diversos estudos demonstram um amplo espectro antibacteriano dos extratos de *D. bulbifera*: OKIGBO et al. (2009), descrevem atividade antimicrobiana do extrato aquoso contra *Escherichia coli*, e, para o extrato etanólico, ação contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Em um teste antibacteriano *in vitro*, HU et al. (2007), detectaram atividade para o extrato provindo de decocção e para o extrato obtido com solvente orgânico de *D. bulbifera*, demonstrando atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* por método de tubo, constatando que o efeito antibacteriano do extrato obtido com acetona, foi mais potente em relação ao extrato aquoso (decocção) bem como aos outros extratos, acetato de etila, etanólico a 95% e extrato metanólico.

TEPONNO et al. (2006), ao realizarem testes com extratos obtidos a partir de diferentes solventes, classificaram o extrato de diclorometano como o que se mostrou mais eficiente na ação contra *Pseudomonas aeruginosa* frente ao extrato etanólico a 95% com halo de inibição de 14,20 mm, *Salmonella typhi*,

*Salmonella paratyphi* A e *Salmonella paratyphi* B com halo de 7 mm e 12 mm respectivamente, enquanto que os extratos brutos, metanólico-aquoso, demonstraram fraca atividade inibitória. Por sua vez, o extrato butanólico não apresentou nenhuma atividade contra esses micro-organismos.

Ainda no estudo de ADELEYE e IKOTUN (1989), foi apresentado que a di-hidrodiósarina isolada de extrato clorofórmico de *D. bulbifera* possui atividade antifúngica frente ao *Sclerotium rolfsii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *Macrophomina phaseolina* e *Botryodiplodiu theobromae*.

Diante dos inúmeros relatos encontrados em literatura sobre+ o potencial antimicrobiano da *D. bulbifera*, destaca-se a importância deste estudo para analisar a possível atividade antimicrobiana da *D. bulbifera* encontrada na região sul do Brasil.

### **3.6 Atividade Antitumoral**

A atividade antiproliferativa é considerada um parâmetro para a caracterização da atividade antitumoral (RAMIREZ-MARES et al., 2004), podendo ser utilizados vários métodos para detecção desta atividade, por exemplo, medidas de incorporação de nucleotídeos e contagem de clonogênicos. Dentre os testes colorimétricos, a taxa de crescimento e multiplicação pode ser medida indiretamente por indicadores de crescimento, que se utilizam da observação de aparecimento de coloração, que será diretamente proporcional ao número de células viáveis (ALMEIDA, 2014).

Estima-se que uma parcela muito pequena de plantas e seus extratos sejam estudadas fitoquimicamente e uma parcela menor ainda é avaliada através de estudos farmacológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Testes etnofarmacológicos representam uma via para a descoberta de moléculas com ação terapêutica, constituindo-se em uma fonte potencial de avanço para a indústria farmacêutica (SANTOS, PINHEIRO, 2016), seja na descoberta de novas moléculas bioativas ou no aprimoramento da eficácia de terapias já existentes através da tecnologia farmacêutica (BAVELONI et al., 2017).

Em 1950, com a descoberta dos alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e o isolamento de podofilotoxinas citotóxicas, deu-se início a

pesquisa de agentes anticancerígenos naturais. Essa busca justifica-se pela necessidade de produção de drogas eficazes e com redução dos efeitos colaterais que os quimioterápicos utilizados nos dias atuais causam (PRAKASH; KUMAR; KUMAR, 2013).

Dentre os relatos das atividades farmacológicas do tubérculo da *D. bulbifera*, está o controle na proliferação de células neoplásicas, como por exemplo a linhagem S180 (murinho sarcoma) e H22 (carcinoma hepatocelular). O potencial de inibição de tumores e o mecanismo pelo qual age ainda não está elucidado por completo, sugerindo assim estudos nesta área a fim de qualificar os compostos e o mecanismo de ação pelo qual a *D. bulbifera* exerce ação antitumoral (WANG et al., 2012).

Frente ao exposto, busca-se a descoberta de novos compostos com atividade antitumoral, visto que os dados apresentados indicam a ação da *D. bulbifera* contra algumas linhagens tumorais.

### 3.6.1 Método colorimétrico MTT

Este método utiliza-se do doseamento da atividade metabólica de células viáveis, através de um ensaio colorimétrico. A reação baseia-se na redução dos sais de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, MTT) através da ação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato-tetrazolium redutase que está presente somente em células viáveis. A partir do momento da redução, os sais de tetrazolium formam o sal formazan, que é hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO) podendo este ser quantificado por absorvância (RISS, MORAVEC, 2004).

### 3.6.2 Linhagens celulares

A linhagem Raji é representada por células B linfoblásticas derivadas do linfoma de Burkitt. Este linfoma desenvolve-se a partir da perda de controle de proliferação de uma célula do centro germinativo, pela ativação do gene C-MYC (DE SOUSA BARBOSA et al., 2015).

Esta foi a primeira linhagem de células humanas constituídas de origem hematopoiética. Possuem forma arredondada, capazes de formar agrupamentos na forma de cachos, crescem em suspensão e apresentam diâmetro de 10 a 13  $\mu\text{m}$ . Sua replicação ocorre de 24 a 36 horas. Na fase estacionária de crescimento, as células formam grumos menores, podendo apresentar-se soltas e mais escuras, com irregularidades de superfície, o que faz com que seus tamanhos não sejam homogêneos (MARTINS et al., 2005).

Esta linhagem de células tem o uso difundido como ferramenta em pesquisas relacionadas à compreensão de células hematopoiéticas e outras patologias malignas, ainda são utilizadas na detecção de complexo imune (KARPOVA et al., 2005).

A linhagem celular K562 é representada por células de leucemia mielóide crônica, nas quais ocorre a presença do cromossomo Philadelphia (Ph), (cromossomo 22 com uma alteração de translocação). A referida linhagem possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação quando entra em contato com diferentes agentes químicos, em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal (HbF), ou em células megacarióticas, com aumento de tamanho e ploidia (número de cromossomos), esta plasticidade concede à linhagem, habilidades para trabalhos que envolvem terapia de diferenciação de câncer, como o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular, e ainda, pela sua característica eritróide, permite a abordagem de estudos sobre expressão de hemoglobina, de relevada importância no tratamento de pacientes com anemia falciforme e talassemias (DELGADO-CAÑEDO, NARDI, CHIES, 2005).

Já a linhagem celular HL60 representa uma linhagem de células de leucemia promielocítica humana. Esta constitui-se como um subtipo de leucemia mielóide aguda (LMA), possui morfologia hiperangular, predominantemente em promielócitos. A diferenciação dessas células com características morfológicas de granulócitos pode ser induzida por vários compostos como dimetilsulfóxido (DMSO), hipoxantina, dimetilformamida, actinomicina, ácido retinóico (ANAZETTI; QUIRÓS; MELO, 2003)

A linhagem Jurkat corresponde a uma linhagem de células linfocitárias do tipo T. As células Jurkat são usualmente empregadas em estudos de leucemia celular aguda, bem como em pesquisas sobre marcação e expressão de

receptores de quimocinas susceptíveis à entrada viral, particularmente relacionada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esta linhagem celular é capaz de produzir interleucina 2 (IL-2), conferindo assim alta importância perante a comunidade científica (CÓRDOBA, 2017).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização fitoquímica

#### 4.1.1 Coleta e identificação do material botânico

A coleta do material botânico foi realizada no município de Pato-Branco PR, no horto do Câmpus da UTFPR, no mês de março de 2018. A identificação do material vegetal foi realizada pela professora Dr.<sup>a</sup> Giovana Faneco Pereira do Departamento de Agronomia da UTFPR, Câmpus Pato Branco, a exsicata realizada encontra-se depositada no herbário da UTFPR-PB.

#### 4.1.2 Preparo do material vegetal

A partir de 3 kg do tubérculo de cará-moela, amostras foram preparadas, iniciando-se com lavagem em água potável corrente, realizando-se em seguida a sanitização do tubérculo com hipoclorito de sódio 200 mg L<sup>-1</sup> por 5 min (ANTONIOLLI et al., 2005). As amostras foram então cortadas em forma de cubos de 1 cm, embaladas em saco plástico, seladas, retirando-se completamente o ar do pacote e colocadas em *ultrafreezer*. Posteriormente foram liofilizadas.

#### 4.1.3 Obtenção dos extratos

##### 4.1.3.1 Extrato etanólico 75% (DB-E)

Os tubérculos secos após liofilização, foram submetidos à extração a frio, com etanol 75%, com renovação do solvente em intervalos de 48 horas, e

agitação constante, com 3 trocas de solventes, conforme método realizado por WANG et al. (2012).

Posteriormente o extrato foi filtrado a vácuo. O resíduo remanescente foi desprezado e o extrato concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C. Na sequência, foi armazenado na capela para completa evaporação do solvente.

Em seguida, o extrato foi particionado, utilizando solventes em gradiente de polaridade crescente, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol e água (GAO et al., 2002).

#### 4.1.3.2 Partição

O extrato etanólico foi particionado, em funil de separação, inicialmente utilizando CHCl<sub>3</sub> (clorofórmio). O volume total do solvente (230 mL), foi adicionado, dividido em 3 porções.

Na terceira agitação, após retirar a pressão total, o funil foi mantido em repouso por 15 min para separação da fase orgânica e aquosa. A fase orgânica, correspondente ao extrato CHCl<sub>3</sub> foi coletada em um balão de fundo redondo, posteriormente concentrada em evaporador rotativo, à pressão reduzida e temperatura de 40 °C. Em seguida, armazenada na capela para completa evaporação do solvente. Posteriormente à evaporação, o extrato foi liofilizado, dando origem ao extrato clorofórmico DB-C.

Na sequência, foi realizada partição utilizando o solvente acetato de etila (380 mL), e o mesmo procedimento descrito anteriormente, originando o extrato de acetato de etila DB-A.

Da mesma maneira, realizou-se a partição com o solvente *n*-butanol (380 mL), gerando o extrato *n*-butanólico DB-N.

E, por fim, foi realizada partição com o solvente, água (380 mL) dando origem ao extrato aquoso DB-W.

Após a obtenção de cada extrato, os mesmos foram armazenados em frascos âmbar e em dessecador a temperatura ambiente, até o momento da realização dos testes de antioxidantes, antimicrobianos e antitumorais.

#### 4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi realizada, utilizando discos de KBr. As medidas foram realizadas a partir de 32 varreduras no intervalo de região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em espectrofotômetro da marca Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Frontier. O Infravermelho pertence a Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Pato Branco.

## 4.2 Atividade antioxidante

### 4.2.1 Determinações de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por SINGLETON (1999). Este método utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, que na presença de fenóis e em meio alcalino reduz o fosfomolibdato-fosfotungstato à molibdênio, resultando em uma coloração azul (SILVA et al., 2010). Os extratos foram preparados em concentrações de 0,5  $\text{mg ml}^{-1}$ , 1,0  $\text{mg ml}^{-1}$  e 2,0  $\text{mg ml}^{-1}$  dissolvidos em uma concentração etanol padrão analítico. Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato foi submetida ao contato com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%) em tubos de ensaio. Em seguida, durante o tempo de 5 minutos, os extratos foram mantidos em repouso e, na sequência, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). As soluções foram conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas leituras em espectrofotômetro em 740 nm.

O padrão utilizado como referência foi o ácido gálico e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ) e calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variam de 25 a 125  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH

A atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET (1995). O radical DPPH possui uma absorção característica a 517 nm. Mediante sua redução, proporcionada por um composto antioxidante, ocorrerá a retirada de um hidrogênio (H<sup>+</sup>) do composto, caracterizando a reação.

Foram adicionados 0,5 mL de cada extrato, previamente diluídos com etanol 80%, em tubo de ensaio, conforme estudo proposto por CHEN et al. (2013), nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, juntamente a 3,0 mL de etanol e 0,3 mL da solução alcoólica de DPPH (0,5 mmol L<sup>-1</sup>). O tempo de reação foi de 45 min, e após foram realizadas as leituras das soluções em comprimento de onda de 517nm.

A curva padrão foi construída a partir do antioxidante sintético Trolox em diferentes concentrações (15, 25, 50, 75 e 100 μmol L<sup>-1</sup>). Em seguida foi determinada a capacidade antioxidante das amostras pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox equivalente por grama de material (μmol Trolox g<sup>-1</sup>). Desta forma, a curva cinética foi desenvolvida avaliando-se o tempo de estabilização do radical DPPH e a porcentagem de atividade antioxidante (%AA), calculados a partir da equação 1. As análises foram realizadas em triplicata.

Equação 1: Porcentagem de Atividade Antioxidante (%AA)

$$\%AA = \left[ \frac{(Abs(\text{controle}) - Abs(\text{amostra})) \times 100}{Abs(\text{controle})} \right] \text{Equação 1}$$

Em que:

Abs<sub>amostra</sub> = Absorbância da amostra com o DPPH;

Abs<sub>controle</sub> = Absorbância da solução DPPH sem a amostra.

#### 4.2.3 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método de Captura do ABTS•+

O método ABTS•+ utiliza o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) para medir a capacidade antioxidante, através do sequestro deste. O protocolo para análise foi baseado na metodologia proposta por RE et al. (1999), com modificações.

O radical/cátion ABTS foi formado a partir da reação de 5 mL da solução catiônica de ABTS ( $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e permaneceu à temperatura ambiente e ausência de luz por um período de 16 horas. Em seguida, foi diluído em 100 mL de etanol com o 1,0 mL do radical/cátion ABTS, até atingir absorvância de 0,700 ( $\pm 0,05$ ), no comprimento de onda de 734 nm.

A curva padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético, equivalente à vitamina E, usada como referência, foi realizada partindo-se de uma solução a 2 mmol (25 mg em 50 mL de etanol), através da qual, foram preparadas as diluições plotadas na curva, variando a concentração de 100  $\mu\text{mol}$  a 2.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (100, 500, 1.000, 1.500, 2.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). A curva padrão expressa a atividade antioxidante pela captura do radical/cátion ABTS em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente por grama de amostra ( $\mu\text{mol TEACg}^{-1}$ ), (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

Em seguida, foram transferidos 30  $\mu\text{L}$  de cada concentração do padrão (em triplicata) para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 3 mL do radical/cátion ABTS previamente preparado e a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis em 734 nm, após a solução permanecer em repouso, durante 6 minutos.

Através das absorvâncias das diferentes concentrações do padrão Trolox, foi elaborada a curva de calibração no Excel e os dados plotados em gráfico, obtendo-se assim a equação da reta, possibilitando o cálculo da atividade antioxidante para cada extrato, a qual foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de Equivalentes Trolox (ET) por grama de amostra  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ .

A partir dos extratos, foram preparadas soluções em diferentes concentrações, conforme estudo proposto por CHEN et al. (2013), nas concentrações de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  e 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$  e suspendidas com etanol 80%. De cada solução, 30  $\mu\text{L}$  foram transferidos, em triplicata, para tubos

de ensaio e então adicionados 3,0 mL de solução etanólica do radical/cátion ABTS. Após 6 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis a 734 nm, utilizando-se o etanol 80% como branco.

#### 4.2.4 Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP.

A atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), foi realizada com base na metodologia descrita por BENZIE e STRAIN (1996), com adaptações.

O preparo do reagente foi realizado através da mistura de 25 mL de solução tampão acetato de sódio ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 3,6); 2,5 mL de uma solução de TPTZ ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TPTZ em  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCl) e 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em solução aquosa.

Foram adicionados a tubos de ensaio, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  dos extratos, previamente diluídos e 3 mL do reagente FRAP, sendo então armazenados na ausência de luz e em temperatura de 37 °C, em banho-maria, pelo período de 30 minutos. A partir de então, a curva de calibração foi construída utilizando sulfato ferroso em diferentes concentrações (200, 500, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Em um comprimento de onda de 595 nm foram determinadas as absorbâncias das soluções e os resultados da atividade antioxidante pelo método FRAP foram expressos em  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  por grama de amostra ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$ ).

### 4.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos

Os testes da atividade antimicrobiana foram realizados frente a micro-organismos disponíveis no laboratório de biotecnologia da UTFPR-PB, sendo estes micro-organismos de importância clínica, alimentar e tecnológica (PONCE et al., 2005; SANTOS; RIBEIRO, 2016; PAVA; SANABRIA; LEAL, 2017) conforme o disposto na Tabela 1.

Foram utilizadas as metodologias de disco difusão e microdiluição em caldo, definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos (ALVES et al., 2008). As técnicas propostas

foram realizadas com base na metodologia sugerida por KARAMAN et al. (2003) e RABANAL et al. (2002), com algumas adaptações e por protocolos padrões CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documentos M27-A3 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), M02-A11 (Padrões de desempenho para testes em disco de susceptibilidade antimicrobiana), M7-A6 (Metodologia do Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico).

**Tabela 1 - Micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos.**

<b>Nome</b>	<b>ATCC</b>	<b>Classificação</b>
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bactéria Gram Neg.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Bactéria Gram Pos.
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	0028	Bactéria Gram Neg.
<i>Listeria monocytogenes</i>	19111	Bactéria Gram Pos
<i>Candida albicans</i>	10231	Fungo dimórfico

Fonte: autoria própria

#### 4.3.1 Disco Difusão

O método de avaliação antimicrobiana por disco difusão foi realizado seguindo a metodologia proposta por KARAMAN et al. (2003) e RABANAL et al. (2002), embasado no protocolos CLSI (M02-A11), com modificações.

Primeiramente os micro-organismos selecionados foram reativados a partir das culturas estoque em Caldo Mueller Hinton. As bactérias foram semeadas pelo método de esgotamento em placas de Agar Mueller Hinton, ficaram em estufa microbiológica por 24 h, à temperatura de 35-37 °C para bactérias a fim de obter-se colônias isoladas, a levedura foi semeada em Agar Saboraund e incubada a 27-28 °C por 24h.

Após a incubação, assegurando-se que não houve contaminação, as cepas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo água peptonada tamponada, preparada conforme orientação do fabricante; esterilizadas até atingir concentração 0,5 da escala McFarland ( $\pm 1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Após ativação e padronização do inóculo, foram preparados os controles.

O controle positivo consistiu em tetraciclina para bactérias e fluconazol para a levedura, ambos a uma concentração de  $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle negativo foi preparado com o solvente DMSO 10% segundo metodologia adaptada de MIRANDA et al. (2015) e água peptonada 0,1% esterilizada (KARAMAN, 2003) na mesma proporção utilizada para solubilizar as amostras.

Em seguida,  $100 \mu\text{L}$  da suspensão microbiana, foram inoculadas em uma placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton para bactérias e Sabouraud com cloranfenicol para fungos. Com um swab esterilizado, o inóculo foi distribuído uniformemente sobre toda placa, posteriormente,  $10 \mu\text{L}$  da amostra do extrato DB-E a uma concentração de  $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram impregnados em discos de 5 mm, e estes posicionados sobre o meio de cultura já inoculado, a fim de avaliar se o material testado possuía efeito inibitório sobre o micro-organismo.

As placas inoculadas e os controles foram incubados em estufa à temperatura de  $35-37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h para bactérias, e  $27-28 \text{ }^\circ\text{C}$  para leveduras por 24 h. Após este período, foi realizada a medição da circunferência dos halos de inibição com paquímetro, avaliando se houve crescimento radial ou não, os resultados foram expressos em mm (OSTROSKY et al., 2008).

#### 4.3.2 Microdiluição em caldo

A análise de microdiluição em caldo foi determinada segundo a metodologia definida por KARAMAN et al. (2003), e pelos protocolos padrões CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), M27-A3 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), M02-A11 (Padrões de Desempenho para Testes em Disco de Susceptibilidade Antimicrobiana), M7-A6 (Metodologia do Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico), com algumas modificações. Estas técnicas testam a sensibilidade das bactérias e fungos por meio da microdiluição da amostra em caldo, utilizando microplacas com 96 poços.

Para esta técnica, a partir do preparo da solução de micro-organismos utilizando escala de McFarland ( $\pm 1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) como descrito

anteriormente. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do caldo (BHI para bactérias e Sabouraud para leveduras); 100  $\mu\text{L}$  da amostra a ser testada e 5  $\mu\text{L}$  de inóculo. As diluições dos extratos usadas foram: 10.000, 1.000, 500 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle positivo consistiu em tetraciclina para bactérias e fluconazol para a levedura, ambos a uma concentração de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ . O controle negativo foi preparado com o solvente DMSO 10% e água peptonada (KARAMAN, 2003).

As placas foram inoculadas e os controles foram incubados em estufa a 35-37  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para bactérias e 25-27  $^{\circ}\text{C}$  para leveduras. Posteriormente, foi realizada a identificação da menor concentração onde houve inibição do crescimento microbiano (CIM), através da adição de 20  $\mu\text{L}$  do revelador resazurina a 0,01%, o qual age como indicador da multiplicação celular e/ou viabilidade. Após o tempo de 2 h de incubação, amostras com a cor azul representam a ausência de multiplicação e/ou viabilidade celular e a rosa multiplicação e/ou presença de viabilidade.

#### *4.3.3 Concentração bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM)*

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada levando-se em conta a menor concentração dos extratos em estudo, capaz de inibir o crescimento microbiano, caracterizada pela ausência de crescimento deste em caldo BHI e caldo Sabouraud, após 24 horas em estufa a 35-37  $^{\circ}\text{C}$  para bactérias e 25-27  $^{\circ}\text{C}$  para leveduras. Quando fosse possível a observação do crescimento ao menos de uma colônia, considerou-se que houve apenas inibição e não morte da bactéria, caracterizando o efeito do extrato como bacteriostático.

## **4.4 Atividade antitumoral**

### *4.4.1 Linhagem Celular*

As células utilizadas no estudo foram de linhagens K562 (Leucemia Mieloide Crônica), HL60 (Leucemia Mieloide Aguda), Raji, constituída de células

B linfoblásticas e Jurkat (leucemia linfóide aguda tipo T). Todas as células foram cultivadas em garrafas plásticas (25 cm<sup>3</sup>) contendo o meio RPMI 1640 (meio de cultura celular tamponado com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular) (Sigma R6504) e suplementadas com 50 µmol L<sup>-1</sup> de 2-mercaptoetanol e 10% de soro de vitelo fetal (Gibco 16000-044), 1% de penicilina (10000 UI mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (10 mg mL<sup>-1</sup>) (Gibco 15070) a 37 °C em uma atmosfera constituída de CO<sub>2</sub> a 5%, o meio foi trocado a cada 48 h, em seguida foram realizadas as exposições das partições da *D. bulbifera* frente a estas linhagens celulares.

#### 4.4.2 Ensaio colorimétrico MTT (tetrazólio)

As linhagens celulares acima indicadas foram determinadas pelo ensaio colorimétrico MTT, baseando-se na metodologia proposta por MOSMANN (1983). O MTT é capturado pelas células e reduzido intracelularmente em uma reação dependente da mitocôndria para produzir o formazan. A capacidade das células para reduzir o MTT demonstra a sua intolerância e a atividade mitocondrial que serve como medida de viabilidade.

Após um período de 48 h de incubação com as partições obtidas da *D. bulbifera* (concentrações utilizadas 100, 0,50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 µg mL<sup>-1</sup>), as placas foram centrifugadas para sedimentar as células, o sobrenadante foi removido e 10 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio; nº de catálogo Sigma M2128) em PBS (Tampão fosfato-salino) a 5 mg mL<sup>-1</sup> foi adicionado, filtrou-se logo em seguida para esterilizar e remover uma pequena quantidade de resíduo insolúvel presente em alguns lotes de MTT. Nos tempos indicados abaixo, a solução estoque de MTT (10 µl por 100 µl médio) foi adicionada a todos os poços de uma placa, contendo 40 mil células cada, na qual o ensaio seria realizado e estas foram incubadas a 37 °C durante 4 h. Ácido-isopropanol (100 µl de HCl 0,04 eg L<sup>-1</sup> no isopropanol) foi adicionado a todos os poços e misturado para dissolver os cristais azuis escuros. Depois de alguns minutos, à temperatura ambiente, quando todos os cristais foram dissolvidos, as

placas foram lidas em um *Dynatech MR580*, leitor Microelisa, usando comprimento de onda de teste, de 570 nm, um comprimento de onda de referência, 630 nm, e um ajuste de calibração de 1,99 (ou 1,00 se as amostras estivessem fortemente coloridas). As placas foram normalmente lidas dentro de 1 h da adição do isopropanol. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição relativa as células de controle (consideradas como 100%).

#### **4.5 Análises estatísticas**

O conjunto de dados foi submetido ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e como os dados não se apresentaram normais, foram ajustados aos Modelos Lineares Generalizados (MLG). Os dados referentes aos testes de atividade antioxidante deste trabalho, foram analisados por meio de MLG com distribuição de probabilidade gama e função de ligação Log no *software* SPSS. E para avaliar a influência dos diferentes extratos e concentrações utilizados para esta análise, utilizou-se a comparação par a par por meio do teste de Bonferroni. Os gráficos foram plotados por meio do uso do *software* Oringin 8.0 demo (OriginLab).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração

A partição envolve uma dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis. Esse fenômeno pode ser aplicado visando à separação de componentes de uma mistura. Cada substância apresenta um coeficiente de partição ou distribuição, o qual está relacionado com a concentração de cada um dos componentes em cada fase (CHIMIN, 2019). As massas em gramas de cada extrato, DB-C, DB-A, DB-N e DB-W, obtidos pelo uso da técnica de particionamento em funil de separação, a qual permite o contato direto do extrato bruto (etanol 75%) e seu solvente extrator estão demonstradas na Tabela 2.

**Tabela 2: Massa em gramas (g) dos extratos particionados a partir do extrato bruto (etanol 75%) do tubérculo de Cará-moela.**

<b>Solvente/ extrato</b>	<b>Massa (mg)</b>
Clorofórmio/ DB-C	33mg
Acetato de etila/ DB-A	200mg
N-butanol/ DB-N	7525mg
Água/ DB-W	11993mg

DB-C: Extrato clorofórmico, DB-A: Extrato de acetato de etila, DB-N: Extrato *n*-butanólico, DB-W: Extrato aquoso.

Fonte: **Autoria própria, 2018.**

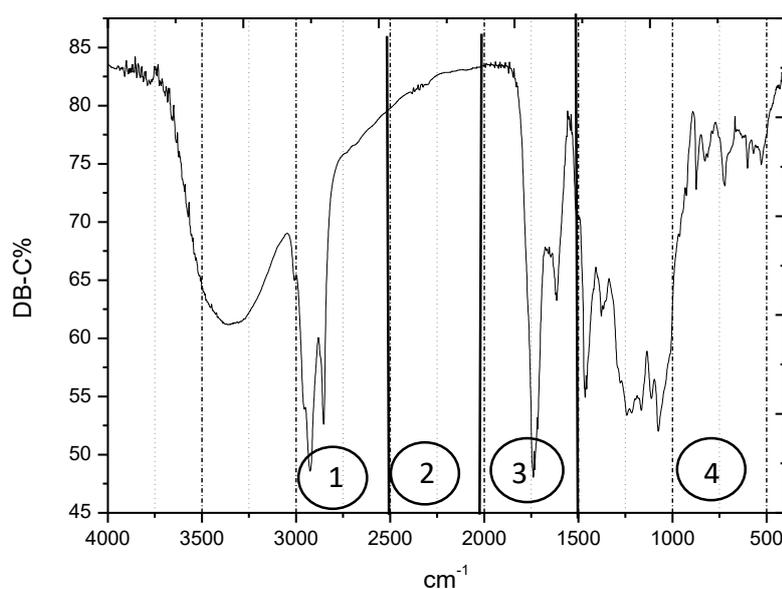
Desta maneira, pode ser observado que o rendimento da extração foi influenciado diretamente pelo solvente utilizado. Quando comparado os valores de rendimento do extrato DB-W, nota-se expressiva diferença, principalmente quando levado em consideração DB-C, há uma diferença de 99,7% em rendimento entre estes extratos, quando assumido DB-W como extração máxima obtida.

Estudos realizados por MELECCHI (2005), evidenciam diferenças notáveis na capacidade extrativa de solventes, ainda relatam a influência

exercida pelo método empregado. Desta forma, os dados acima expostos permitem análise quantitativa de substâncias, proporcionais à massa obtida nesta etapa.

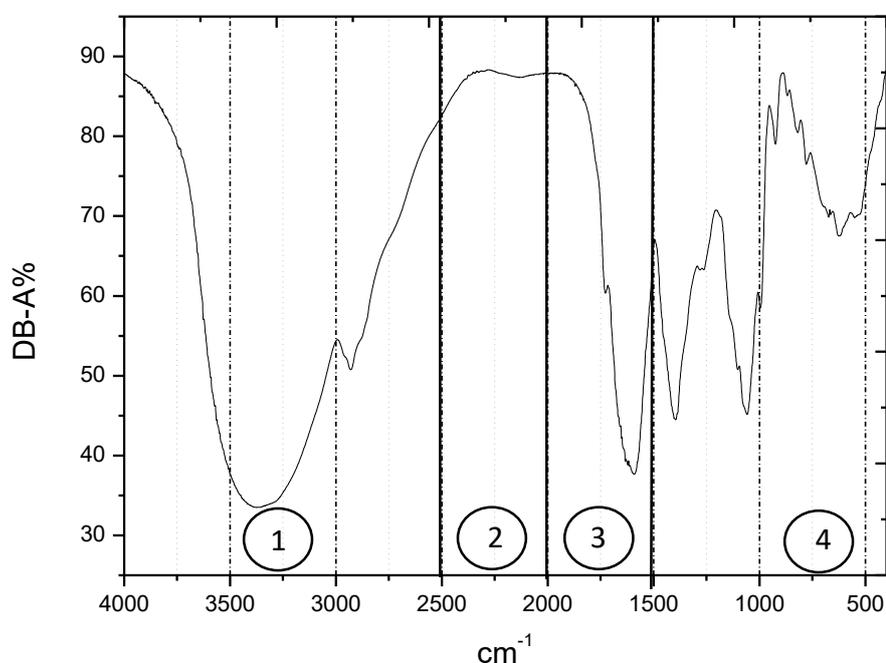
## 5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os extratos obtidos do tubérculo do Cará-moela foram avaliados pela técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, os espectros de infravermelho foram divididos em quatro regiões, seguindo o modelo proposto por MCMURRY (2010). A região **1** compreende a faixa de 4000 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  e correspondendo a absorções provocadas por estiramentos de ligações simples N-H, C-H, e O-H, a região **2**, de 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento de ligação tripla de nitrilas e alquinos, a região **3** compreende a faixa de 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  e corresponde as absorções das ligações duplas de todos os C=O, C=C e C=N, enquanto que a região **4** fica abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  e é conhecida como a região de impressão digital, ela corresponde a um grande número de absorções devido a uma variedade de vibrações de ligações simples C-C, C-O, C-N e C-X (X representa um halogênio). Os dados encontram-se disponíveis nas Figuras 6, 7, 8 e 9 a seguir.



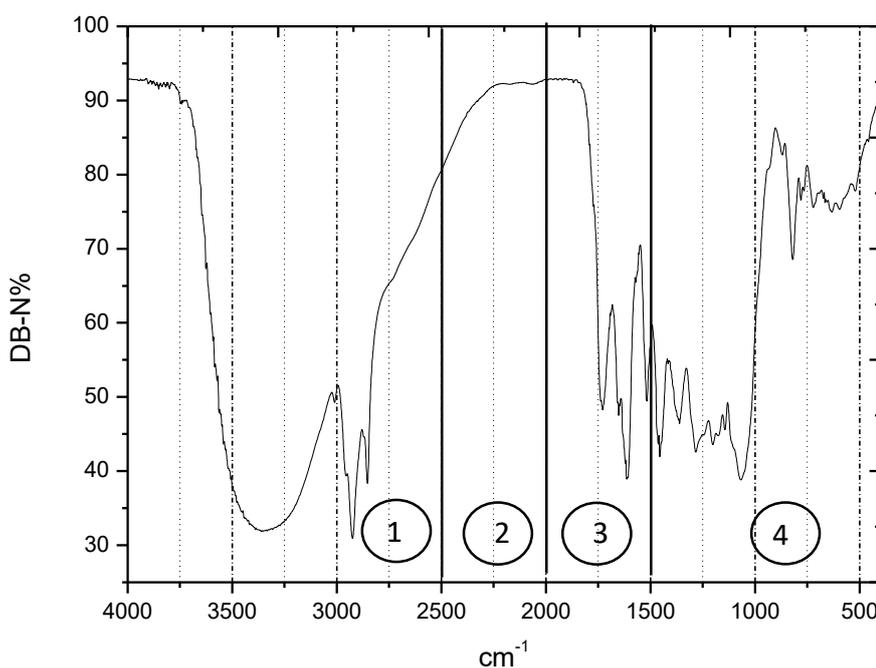
**Figura 6 - Espectro de IV(TF) do extrato Clorofórmico do tubérculo cará-moela (DB-C)**  
Fonte: autoria própria.

A partir do espectro de Infravermelho do extrato de clorofórmio pode-se observar, na região 1, a presença da banda de deformação axial de O–H, em  $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ , característica do grupamento O–H, apresentando ligação de hidrogênio intermolecular, uma vez que a banda de “hidroxila livre”, absorve fortemente entre  $3650$  e  $3584 \text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN, 2006). A absorção correspondente à deformação axial de C–H de alcanos é observada, geralmente na região de  $3000$  a  $2840 \text{ cm}^{-1}$ . Destaca-se na região 3, uma absorção intensa, em torno de  $1750 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à presença de carbonila na composição desse extrato. Na região 4, apesar do espectro não apresentar sinais muito nítidos, é possível destacar a presença de uma absorção forte próximo a  $1500 \text{ cm}^{-1}$  (vibrações de esqueleto aromático), que pode ser um indicativo da presença de compostos aromáticos, quando associado a outros sinais, conforme relatado a seguir: entre  $900$  e  $675 \text{ cm}^{-1}$ , estão as bandas que dão mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos, elas provêm da deformação angular fora do plano das ligações C–H do anel. As bandas de deformação angular no plano, aparecem na região entre  $1300$  e  $1000 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 7 - Espectro de IV(TF) do extrato de acetato de etila do tubérculo cará-moela (DB-A).Fonte: Autoria própria.**

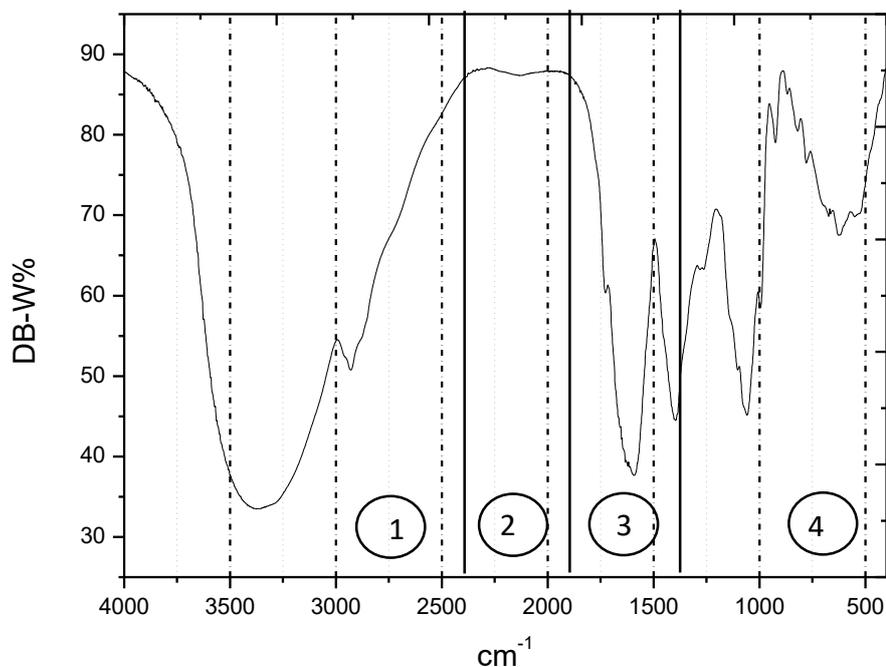
O espectro do acetato de etila (DB-A), aparentemente também apresenta bandas características de O – H, de aromáticos e, mostra um sinal de carbonila bem intenso, mas não muito bem definido, em uma região próxima a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , portanto, diferente do espectro do extrato de clorofórmio. Sabe-se que sinais de carbonila na região de  $1640$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$  (banda larga) pode ser em função da existência de tautômeros cetona e enol. A conjugação de uma carbonila com um alqueno ou com um grupo fenila, leva à absorção em  $1685$ - $1666\text{ cm}^{-1}$ . As quinonas possuem os grupamentos carbonila em um mesmo anel e absorvem entre  $1690$  e  $1655\text{ cm}^{-1}$ . Essas observações procuram justificar a existência de sinal de absorção de carbonila em região mais baixa do espectro, próximo a  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, essa banda de absorção próxima a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuída à presença de amins primárias (ligação N–H). Outra possibilidade, em função de ser uma banda larga, que seja atribuída à presença da ligação N–O, de grupos nitro que absorvem na região de  $1500\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 8 - Espectro de IV(TF) do extrato de *n*-butanolico do tubérculo cará-moela (DB-N).  
Fonte: Autoria própria**

Com relação ao espectro de infravermelho do extrato de *n*-butanol, obtido também por partição, o mesmo apresenta-se muito semelhante ao espectro DB-C, mas principalmente na região conhecida como “região digital” (região 4),

apresenta um maior número de absorções, indicando, provavelmente, a extração de maior número (variedade) de metabólitos especializados presentes no carámoela, do que o obtido na extração com clorofórmio. Outra observação refere-se à região 3, que apresenta uma absorção intensa e bem definida na região de  $1750\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à carbonila, mas observa-se também um sinal, um pouco menos intenso, por volta de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , que semelhante ao espectro DB-A, pode ser atribuído a existência de tautômeros cetona e enol, ou conjugação de uma carbonila com um alqueno ou com um grupo fenila, ou ainda, quinonas, que possuem os grupamentos carbonila em um mesmo anel e absorvem entre  $1690$  e  $1655\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 9 - Espectro de IV(TF) do extrato aquoso do tubérculo carámoela (DB-W).**  
Fonte: Autoria própria

O espectro de infravermelho obtido a partir do extrato aquoso de carámoela é muito semelhante ao espectro de acetato de etila, em todas as suas regiões. GHOSH et al. (2015) observaram o espectro de IV-TF do extrato aquoso do tubérculo de *D. bulbifera*, que indicou forte absorção em  $3373\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao grupo hidroxila em compostos polifenólicos. Eles observaram também, bandas bem definidas em  $2937$ ,  $1647$ ,  $1518$  e  $1024\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a

estiramentos C–H, ligação N–H de aminas primárias, estiramento da ligação N–O de grupos nitro e estiramento C–C, respectivamente.

### 5.3 Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos do tubérculo *D. bulbifera* variou de 54,32 a 481,50 mg EAG g<sup>-1</sup> conforme pode ser observado na Tabela 3. Os dados também podem ser observados no apêndice F.

São visíveis os efeitos dos tratamentos aplicados, solventes DB-A, DB-E, DB-W, DB-C e DB-N, bem como a concentrações dos mesmos quanto a extração de CFT.

**Tabela 3 – Resultados médios e EP obtidos para a análise de CFT (mg EAG g<sup>-1</sup>) para os extratos de *D. bulbifera*.**

Extratos	Concentrações (mg EAG g <sup>-1</sup> )		
	0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	2,0 mg mL <sup>-1</sup>
DB-E	391,50 ± 44,43 A	409,50 ± 47,28 A	236,62 ± 27,17 A
DB-C	54,15 ± 6,33 C	58,32 ± 6,72 C	242,25 ± 27,79 C
DB-A	481,50 ± 56,05 A	393,25 ± 45,93 A	267,87 ± 30,64 A
DB-N	341,50 ± 28,56 B	350,75 ± 16,19 B	264,12 ± 8,64 B
DB-W	98,72 ± 8,17 D	76,23 ± 8,71 D	54,32 ± 6,29 D

Letras maiúsculas diferentes representam variação estatística frente ao conteúdo de compostos fenólicos extraídos por diferentes solventes.

Fonte: Autoria própria

Quando comparado os resultados do presente estudo com os de SONG et al. (2010), observa-se um resultado expressivo na extração dos CFT do tubérculo *D. bulbifera*, pois, os referidos autores encontraram como resposta um potencial máximo de extração de CFT de 59,43 EAG g<sup>-1</sup>. Estes trabalharam com extrato metanólico em uma concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto que no presente estudo, a concentração utilizada com valor mais expressivo foi a de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, resultando em 391,50 mg EAG g<sup>-1</sup> para o extrato DB-E. Os mesmos

autores avaliaram outras 56 plantas, porém a que apresentou o melhor resultado quanto ao teor de fenólicos foi a *D. bulbifera*.

No estudo de LI et al. (2013) ao trabalharem com extrações realizadas com água a 100 °C, obtiveram resultados para CFT de  $24,71 \pm 1,03$  mg EAG g<sup>-1</sup>, demonstrando assim, como foi positiva a resposta obtida no presente trabalho, pois o menor valor na extração de fenólicos totais (CFT), foi de 54,15 mg EAG g<sup>-1</sup>, obtida do DB-C, utilizando solvente de menor polaridade quando comparado à água, utilizada pelos autores, bem como diferente da partição que representou o melhor resultado para este estudo, o DB-A 481,50 mg EAG g<sup>-1</sup>, utilizando solvente de média polaridade (acetato de etila).

A análise estatística realizada pelo método de Modelos Lineares Generalizados (MLG) demonstra (Tabela 4) que as oito variáveis testadas, solvente e concentrações apresentaram influência significativa na extração de compostos fenólicos, conforme pode ser observado na Tabela 4 ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 4 – Teste de efeito do modelo MLG para CFT.**

Origem	CFT		
	Qui-quadrado de Wald	G.L.	Probabilidade
(Intercepto)	29095,93	1	$p < 0,01$
Extratos	533,08	4	$p < 0,01$
Concentrações	8,70	2	$p < 0,01$
Extratos * Conc	183,35	8	$p < 0,01$

G.L Graus de Liberdade. Fonte: autoria própria.

## 5.4 Atividade antioxidante

### 5.4.1 Atividade antioxidante DPPH

Quando observado os resultados obtidos para a análise antioxidante DPPH é possível dizer que o extrato bruto DB-E é o extrato com resultado mais expressivo, na concentração de  $1,0$  mg mL<sup>-1</sup> ( $9306,96$  µmol Trolox g<sup>-1</sup>), conforme

pode ser observado na Tabela 5 e no apêndice G, que representa o gráfico construído em escala logarítmica.

Em relação ao particionamento, quando avaliado os resultados obtidos, percebe-se que a concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> para todas as partições apresentou maior capacidade de estabilização do radical DPPH, sendo a maior, representada pela fração DB-C (372,03 μmol Trolox g<sup>-1</sup>), seguida por DB-W (371,98 μmol Trolox g<sup>-1</sup>), DB-A (220,50 μmol Trolox g<sup>-1</sup>) e por fim DB-N (220,33 μmol Trolox g<sup>-1</sup>) conforme pode ser observado na Tabela 5.

**Tabela 5 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo Método DPPH (μmol Trolox g<sup>-1</sup>) para os extratos de *D. bulbifera*.**

Extratos	Concentrações (μmol Trolox g <sup>-1</sup> )		
	0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	2,0 mg mL <sup>-1</sup>
DB-E	1861,33 ± 47,99 A	9306,96 ± 239,96 A	4655,45 ± 120,03 A
DB-C	372,03 ± 9,59 B	185,89 ± 4,79 B	92,94 ± 2,39 B
DB-A	220,50 ± 5,59 D	104,00 ± 2,75 D	66,58 ± 1,75 D
DB-N	220,33 ± 5,70 C	131,08 ± 3,40 C	81,17 ± 2,10 C
DB-W	371,98 ± 9,59 B	186,00 ± 4,79 B	93,01 ± 2,39 B

Letras maiúsculas diferentes representam variação estatística frente ao conteúdo de compostos fenólicos extraídos por diferentes solventes. Fonte: Aatoria própria

O extrato bruto DB-E, foi a amostra que apresentou maiores valores de atividades antioxidantes em todos os valores de concentração.

Em seu estudo, SAVI (2018), ao avaliar a propriedade antioxidante do polissacarídeo extraído do tubérculo da *D. bulbifera* obteve valores de 0,28 ± 0,01 (mg eq. Trolox g<sup>-1</sup>), no presente estudo trabalhamos com o tubérculo como um todo (extrato não purificado), podemos notar resultados mais expressivos em relação a esta autora ficando na faixa de 220,50 a 1.861,33 mg eq. Trolox g<sup>-1</sup>.

A análise do teste de efeito do modelo realizada pelo método MLG Log (Tabela 6) demonstrou que as 8 variáveis testadas, dentre elas os cinco solventes e as três concentrações, apresentaram influência significativa na extração dos compostos antioxidantes com potencial de sequestrar o radical DPPH, conforme pode ser observado nos dados apresentados na Tabela 6 (p<0,01).

**Tabela 6 – Teste de efeito do modelo MLG Log para DPPH.**

Origem	DPPH		
	Qui-quadrado de Wald	G.L.	Probabilidade
(Intercepto)	731725,913	1	p < 0,01
Extratos	41189,942	4	p < 0,01
Concentrações	2626,643	2	p < 0,01
Extratos * Conc	4006,070	8	p < 0,01

\*G.L-Graus de liberdade. Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.2 Atividade antioxidante FRAP

Analisando os resultados obtidos para o método FRAP, conforme pode ser observado na Tabela 7 e no apêndice H, foi possível identificar que novamente a menor concentração testada, de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> para todas as partições, apresentou o valor mais expressivo de atividade antioxidante. Já quando analisado o extrato bruto DB-E, a concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (9,31 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>) foi a mais expressiva em termos de potencial de redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Pode-se ainda, observar, que as partições apresentaram valores significativamente diferentes, destacando que, para esta análise, a partição realizada com solvente aquoso, foi a que apresentou maior capacidade de redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>.

**Tabela 7 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo método de FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>) para os extratos de *D. bulbifera*.**

Extratos	Concentrações (mmol Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup> )		
	0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	2,0 mg mL <sup>-1</sup>
DB-E	1,86 ± 0,03 C	9,31 ± 0,18 C	4,66 ± 0,09 C
DB-C	1,37 ± 0,03 D	0,19 ± 0,19 D	0,09 ± 0,09 D
DB-A	<b>30,30 ± 0,60 B</b>	13,90 ± 0,28 B	11,91 ± 0,23 B
DB-N	<b>30,63 ± 0,64 B</b>	18,48 ± 0,37 B	7,69 ± 0,15 B
DB-W	<b>58,30 ± 1,18 A</b>	15,48 ± 0,31 A	6,53 ± 0,13 A

Letras maiúsculas diferentes representam variação estatística frente ao conteúdo de compostos fenólicos extraídos por diferentes solventes.

Fonte: Autoria própria.

Neste método, a partição foi de fundamental importância, pois, nota-se o aumento da capacidade antioxidante, quando comparada à fração bruta de

extrato (DB-E). Considerando a concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> para DB-W, o melhor resultado para FRAP (58,30 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>), e para o extrato DB-E (9,31 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>) a concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> foi quem apresentou a melhor atividade, a diferença de extração de antioxidantes com potencial de redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> é de aproximadamente 84% quando comparamos estes valores.

A análise do teste de efeito do modelo realizada pelo método MLG Log (Tabela 8) demonstrou que as 8 variáveis testadas, dentre elas os 5 solventes e as 3 concentrações, apresentaram influência significativa na extração dos compostos antioxidantes com potencial de reduzir o Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, conforme pode ser observado na Tabela 8 ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 8 – Teste de efeito do modelo MLG Log. FRAP**

Origem	FRAP		
	Qui-quadrado de Wald	G.L.	Probabilidade
(Intercepto)	154464,207	1	$p < 0,01$
Extratos	36557,987	4	$p < 0,01$
Concentrações	7465,126	2	$p < 0,01$
Extratos * conc	1964,286	8	$p < 0,01$

G.L-Graus de liberdade. Fonte: Autoria própria

Os compostos antioxidantes extraídos dos tubérculos de *D. collettii* Hook. F. e *D. nipponica* Makino, por GAN et al. 2010, demonstraram atividade antioxidante frente ao método FRAP. Os valores encontrados são de 1,60 ± 0,00011 mmol Fe<sup>2+</sup>g<sup>-1</sup> e 3,96± 0,05 mmol Fe<sup>2+</sup>g<sup>-1</sup>, os extratos foram obtidos a partir de metanol 80% a uma concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>.

Quando comparado aos valores dos autores citados, os valores encontrados para os extratos obtidos a partir do tubérculo da *D. bulbifera*, estes mostram-se superiores em relação as partições DB-A, DB-N e DB-W realizadas na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, os quais apresentaram valores 30,30 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> (DB-A), 30,63 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> (DB-N) e 50,38 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> (DB-W). Quando observado os valores apresentados pela concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, resultados de 13,90 e 15,48 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> para o extrato DB-A e DB-W respectivamente, e superior quando observada a resposta obtida pela partição DB-N, 18,48 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>.

Em estudos realizados por LI et al. (2013), que trabalharam com extratos de plantas medicinais obtidas através do aquecimento a 100 °C de água destilada. Estes autores ao analisarem a atividade antioxidante da *D. bulbifera* L frente ao método FRAP obtiveram respostas de  $85,69 \pm 0,39 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$ , estes valores representam uma porcentagem de 31,96% maior do que os resultados obtidos pelo presente estudo, possivelmente esta vantagem está atrelada à forma de obtenção do extrato.

Diante desses relatos, pode-se dizer que dentre os extratos testados, a partição DB-W e DB-N foram as partições que apresentaram resposta mais significativa para esta análise, sobretudo quando observada a concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , além de demonstrar que a partição potencializou a extração de compostos antioxidantes do tubérculo da *D. bulbifera*.

#### 5.4.3 Atividade antioxidante ABTS

Analisando os resultados obtidos frente ao método ABTS, pode-se observar que a concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  para todas as partições obteve o valor mais expressivo de atividade antioxidante. Quando observado o extrato bruto DB-E, a concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi a que obteve o melhor resultado ( $86619,45 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ). Os dados podem ser observados na Tabela 9 e no apêndice I, representado pelo gráfico construído em escala logarítmica apresentada no apêndice.

Quando contraposto aos valores obtidos aos de SONG et al. (2010), que trabalharam com extrato metanólico da planta *D. bulbifera* em uma concentração de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  obtiveram resultados de  $708.73 \pm 3.7 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ . Comparando os resultados obtidos pelo presente estudo aos deste grupo de pesquisadores, podemos dizer que a partição exacerbou a extração de compostos antioxidantes, visto que as respostas variaram de 510,93 a 21685,63  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  na menor concentração analisada, podendo ser destacado, que a concentração de extrato usada pelo referido autor é 99% superior à utilizada neste estudo, destacando assim a diferença que o solvente extrator pode fazer em uma análise.

Quando comparado os presentes resultados aos de GAN et al. (2010) que trabalharam com as espécies *D. collettii* Hook. e *D. nipponica* Makino, extraídas com metanol 80% a uma concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>, observa-se que estes autores obtiveram uma resposta de 10,82 ± 0,28 e 54,86 ± 3,27 μmol Trolox g<sup>-1</sup> para ambas as espécies. Assim, observa-se que o teor de antioxidantes presentes na *D. bulbifera* são maiores do que os presentes nas amostras analisadas pelos referidos autores.

**Tabela 9 – Resultados médios e EP obtidos para a atividade antioxidante, pelo Método ABTS (μmol Trolox g<sup>-1</sup>) para os extratos de *D. bulbifera*.**

Extratos	Concentrações		
	0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	2,0 mg mL <sup>-1</sup>
DB-E	3464,55 ± 111,58 A	<b>86619,45 ± 2790,13 A</b>	<b>21673,25 ± 698,10 A</b>
DB-C	510,93 ± 16,36 E	34,56 ± 1,11 E	8,64 ± 8,64 E
DB-A	<b>6791,40 ± 212,40 C</b>	1488,93 ± 48,03 C	809,54 ± 25,61 C
DB-N	<b>7428,79 ± 231,92 N</b>	2419,81 ± 79,40 N	629,3 ± 20,23 N
DB-W	<b>21685,63 ± 713,11 B</b>	2879,51 ± 92,91 B	607,70 ± 20,32 B

Letras maiúsculas diferentes representam variação estatística frente ao conteúdo de compostos fenólicos extraídos por diferentes solventes.

Fonte: autoria própria.

Ao se comparar o trabalho desenvolvido por LI et al. (2013), que utilizaram extratos obtidos a partir de água aquecida a 100 °C, na concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>, e obtiveram os resultados de 379.63 ± 26.29 μmol Trolox g<sup>-1</sup>, resultados esses significativos, mas menores do que a maioria dos obtidos por este trabalho, indicando a grande capacidade de estabilizar o radical ABTS pelas amostras do presente estudo.

Pode-se afirmar um resultado muito bom tanto para o DB-E quanto para as partições na extração de compostos antioxidantes capazes de estabilizar o radical ABTS. Dentre as partições, a responsável pela maior extração dos compostos foi a DB-W, que em sua menor concentração obteve a resposta mais expressiva para esta análise (21.685,63 μmol Trolox g<sup>-1</sup>).

A análise do teste de efeito do modelo realizada pelo método MLG Log (Tabela 10) demonstrou que as 8 variáveis testadas, dentre estas os cinco

solventes e as três concentrações diferentes, apresentaram influência significativa, quando avaliada a extração dos compostos antioxidantes com potencial de estabilizar o radical ABTS. Estes resultados podem ser observados por meio da Tabela 10 ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 10. – Teste de efeito do modelo MLG Log. ABTS**

Origem	ABTS		
	Qui-quadrado de Wald	G.L.	Probabilidade
(Intercepto)	802800,17	1	$p < 0,01$
Extratos	52967,90	4	$p < 0,01$
Concentrações	10490,79	2	$p < 0,01$
Extratos * conc	14109,34	8	$p < 0,01$

\*G.L.-Graus de liberdade. Fonte: autoria própria.

#### 5.4.4 Correlação entre Capacidade Antioxidante e Conteúdo Fenólico Total

Diante dos resultados obtidos pelas análises antioxidantes, nos deparamos com a possibilidade da presença de uma ampla gama de compostos com potencial antioxidante, obtidos dos tubérculos da *D. bulbifera*, por meio do extrato bruto do etanol e/ou suas partições. Foram encontradas relações lineares positivas entre o valor da atividade antioxidante CFT. Quando observado os valores de extração de CFT, o extrato DB-A com polaridade intermediária, foi o responsável pela maior extração, enquanto que para os métodos DPPH e ABTS observamos que o extrato que apresentou maior atividade foi o DB-E. Este extrato foi obtido utilizando o solvente etanol 75%, que possui uma polaridade elevada. Assim, pode-se correlacionar a polaridade do solvente que mais realizou extração dos CFT (acetato de etila), média polaridade, portanto, com polaridade próxima ao do solvente (etanol 75%), que apresentou maiores valores de atividade antioxidante para os métodos DPPH e ABTS.

Ainda em relação a estes dois métodos, pode ser relatado também, que para CFT, o segundo extrato com maior capacidade antioxidante, foi o DB-E, mesmo extrato que demonstrou atividade mais significativa em relação à extração dos compostos antioxidantes pelos métodos ABTS e DPPH, como relatado anteriormente.

Quando correlacionada a análise CFT ao método FRAP de extração de compostos antioxidantes, podemos observar que o extrato que apresentou maior atividade por este método foi o DB-W, que possui polaridade superior ao extrato bruto e as demais partições, não apresentando correlação ao maior potencial de extração de CFT.

O fato de não ser o mesmo extrato quem mais extraiu compostos na análise CFT, quando comparado as outras análises antioxidantes, pode estar relacionado à presença de outros metabólitos especializados com propriedades antioxidantes, que possivelmente não foram detectados pelo método CFT. Contudo, o valor de compostos fenólicos representa um teor expressivo pelo método CFT, visto que, quando comparados com outros autores, existem dados na literatura que expressam quantidades de CFT, como no estudo de SONG et al. (2010), com *D. bulbifera*, de  $59.43 \pm 1.03$  mg EAG g<sup>-1</sup> enquanto que no presente estudo foi obtido um máximo de 481,50 mg EAG g<sup>-1</sup>.

Desta maneira, as fortes correlações entre os resultados, usando os métodos de verificação da presença de antioxidantes, DPPH, ABTS e também o FRAP, em conjunto com a teor de CFT mostraram o alto potencial antioxidante que o tubérculo *D. bulbifera* apresenta.

## 5.5 Atividade antimicrobiana

### 5.5.1 Atividade antimicrobiana por disco difusão

Desde as antigas civilizações as plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional, e isso incentiva a pesquisa por novos compostos bioativos, com o propósito de desenvolvimento de novos fármacos. A atividade antimicrobiana tem sido fonte de interesse nos estudos de plantas específicas, pois, representa uma forma alternativa no tratamento de doenças, uma vez que há um aumento de micro-organismos resistentes aos antibacterianos existentes (AMPARO, et al., 2018).

Os resultados para a atividade antimicrobiana do extrato DB-E de Cará-Moela testados em diferentes concentrações, 10.000 µg mL<sup>-1</sup>, 5.000 µg mL<sup>-1</sup>,

1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , através do método de disco difusão frente as bactérias *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* Typhimurium e a levedura *C. albicans* encontram-se dispostos na Tabela 11 e nos apêndices J e K, possibilitando a observação que o extrato DB-E apresentou potencial antimicrobiano frente ao *S. aureus* com média dos diâmetros dos halos de inibição de 4,63 mm na concentração de 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , bem como frente a *E. coli*, com média dos diâmetros dos halos de inibição 5,80 mm na concentração de 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabela 11: Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do extrato DB-E testado contra os micro-organismos**

Micro-organismo	10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	CP*	CN
					CP** mm	
<i>S. aureus</i>	-	4,63	-	-	9,00*	-
<i>E. coli</i>	-	5,80	-	-	10,40*	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium	-	-	-	-	11,33*	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	10,33*	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	9,33**	-

CP\*: Controle positivo tetraciclina 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , CP\*\*: Controle positivo fluconazol 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , CN: Controle negativo com água peptonada. - : Não houve formação de halo de inibição

Em estudo apresentado por ADEOSUN et al. (2016), a resposta para a análise realizada com disco difusão impregnados com o extrato etanólico da casca *D. bulbifera* e testados frente aos patógenos *E. coli* e *S. aureus*, demonstraram atividade em uma concentração de 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com halos de inibição de 15 mm e 17 mm respectivamente, quando no presente estudo o halo de inibição para *E. coli* foi de 5,80 mm e para *S. aureus* foi de 4,63 mm.

Os resultados de OKIGBO et al. (2009), ao analisarem diferentes extratos de plantas, dentre elas, rizomas de *D. bulbifera* frente a três cepas de micro-organismos, *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo. Estes utilizaram extratos etanólicos nas concentrações de 500, 1.000 e 1.500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O extrato etanólico de *D. bulbifera* inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* com concentrações a partir de 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto que para *C. albicans* não ocorreu inibição em nenhuma concentração

frente o extrato etanólico. Para o presente estudo, da mesma forma que o relato anterior, observamos atividade frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* na concentração de 5.000 µg mL<sup>-1</sup> e não ocorreu inibição em disco difusão para *C. albicans*.

Os resultados do presente estudo, encontram-se de acordo com os de MARANDI et al. (2016), em que o extrato etanólico da *D. bulbifera* apresenta maior atividade antibacteriana (aproximadamente 14 e 15 mm de inibição para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente), os extratos foram testados por disco difusão em concentrações de 200 µg por disco.

Segundo Nota Técnica da Embrapa, por GASPAR et al. (2017), o método de disco-difusão, mesmo que de grande importância para testes de “screening” da atividade de antibióticos, demonstra uma sensibilidade muito baixa, quando são estudados extratos de plantas, resultados obtidos, possivelmente, em função da baixa capacidade de difusão do extrato no meio de cultura.

Os autores DA SILVA SILVEIRA et al. (2009), reiteram que substâncias possuem diferentes capacidades de difusão e dissociação em ágar, além disso há que se considerar a influência de diversos fatores neste método, como a ação de enzimas bacterianas, composição do meio de cultura, que na maioria das vezes é polar, densidade do inóculo, período de incubação e ainda a temperatura e estabilidade da amostra a ser testada. Ainda pode ser citada a interferência causada pela presença de matéria particulada na amostra, que interfere na difusão da substância antimicrobiana no ágar.

Embora a droga controle apresente um significativo halo de inibição, os resultados apresentados pelos extratos não podem ser diretamente comparados a esta substância, pois qualquer halo de inibição representa uma triagem para posteriores análises, uma vez que o antibiótico usado se trata de uma substância pura e que os extratos são compostos por diversas substâncias químicas, um *pool* de moléculas, com propriedades químicas distintas, com diferentes pesos moleculares. Essas diferenças dificultam a difusão do extrato pelo meio de cultura e, conseqüentemente, a formação de um halo, visível como o da droga de controle, portanto, considera-se a técnica de Disco Difusão como uma técnica para “screening” e não como resultado definitivo (GASPAR et al., 2017).

### 5.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada utilizando-se todos os extratos, frente aos cinco micro-organismos testados anteriormente pelo método de disco difusão, levando em consideração as limitações e influências negativas que o método pode ter apresentado. A análise foi realizada em triplicata e os resultados encontram-se dispostos na Tabela 12 e em anexo são apresentadas as imagens dos resultados obtidos nesta análise. Os resultados representam a média entre as replicatas.

**Tabela 12: MIC dos extratos que apresentaram atividade, frente aos micro-organismos testados**

Micro-organismos	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$	Respectivos Extratos
<i>S. aureus</i>	5.000; 10.000; 5.000; 10.000	DB-E, DB-C, DB-N, DB-A
<i>E. coli</i>	10.000; 5.000	DB-N, DB-A
<i>S. enterica</i> Typhimurium	10.000	DB-N
<i>L. monocytogenes</i>	10.000	DB-N
<i>C. albicans</i>	10.000; 5.000; 5.000	DB-C, DB-N, DB-A

**MIC: Concentração inibitória mínima. DB-E: Extrato etanólico, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-N: Extrato n-butanólico, DB-A: Extrato acetato de etila.**

**Fonte: Autoria própria.**

O teste de CIM realizado frente à cepa de *S. aureus*, demonstrou atividade antibacteriana do extrato DB-E nas concentrações de 10.000 e 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a mesma resposta foi obtida pelo extrato DB-N. Já para os extratos DB-C e DB-A a resposta antibacteriana ocorreu para a concentração de 10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto que o DB-W não demonstrou resultados antibacterianos.

Em trabalho realizado por GHOSH et al. (2010), observaram atividade do extrato clorofórmico, quando testado contra *S. aureus*, em concordância com o presente estudo, no qual a concentração que apresentou atividade antibacteriana foi a de 10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Já para os dados apresentados por TEPONNO et al. (2006), observaram atividade dos extratos de *D. bulbifera* L. var sativa de diclorometano, n-butanólico e metanólico-aquoso sobre algumas cepas de micro-organismos, porém não obtiveram resposta de atividade sobre *S. aureus* e *E. coli* para o extrato metanólico-aquoso.

Diante da determinação do CIM realizada para *S. enterica* Typhimurium, obteve-se atividade antimicrobiana para o extrato DB-N, na concentração de 10.000 µg mL<sup>-1</sup>. Vale destacar a importância de resultados como este, visto que a bactéria em questão é Gram negativa, intrinsecamente mais resistente a ação de antimicrobianos, então a atividade apresentada deve ser valorizada.

De acordo com RIBEIRO et al. (2012), bactérias Gram negativas são mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias Gram-positivas, característica essa relacionada à presença de uma parede bacteriana que restringe a penetração de moléculas tóxicas, constituída por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas (porinas) que conferem considerável impermeabilidade aos agentes antibacterianos, resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos.

Estes resultados assemelham-se em alguns aspectos, aos obtidos por TEPONNO et al. (2006). Esses autores, testaram o extrato metanólico-aquoso bruto, diclorometano e *n*-butanol, obtidos do tubérculo de *D. bulbifera*, contra diversos micro-organismos. O extrato metanólico-aquoso bruto demonstrou fraca atividade contra *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A e *S. paratyphi* B e nenhuma atividade contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. O extrato de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mostrou notável atividade contra *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A e *S. paratyphi* B e nenhuma atividade contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

A possibilidade de atividade torna-se interessante quando comparado ao presente estudo, uma vez que esse extrato (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), mostrou atividade contra cepas de Salmonella, e, nos resultados encontrados neste estudo, observamos o extrato DB-N ativo para *S. enterica* Typhimurium. Porém, quando os referidos autores testaram o extrato *n*-butanólico, não encontraram resposta antibacteriana, divergindo do presente estudo.

O trabalho acima relatado, deu continuidade à purificação do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, isolando e identificando substâncias que confirmaram forte atividade contra *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A e *S. paratyphi* B, se constituindo em uma possibilidade de continuidade para este trabalho, com o estudo de fitoquímica bio guiado. Portanto, o extrato DB-N se constitui em um possível material de partida para busca de potenciais metabólitos que apresentem atividade contra diferentes espécies de *Salmonella*.

Para a análise da CIM utilizando o micro-organismo *L. monocytogenes*, nota-se novamente, que o extrato com atividade antibacteriana foi o DB-N na concentração de 10.000 µg mL<sup>-1</sup>, reiterando a possibilidade de futuros estudos, tendo como ponto de partida, esta fração. Quanto aos outros extratos, frente a *L. monocytogenes*, nas concentrações testadas, não apresentaram atividade.

Ao ser realizada a análise da CIM frente a bactéria *E. coli*, pode-se observar que a inibição da atividade ocorreu por parte dos extratos DB-N E DB-A, nas concentrações de 10.000 e 5.000 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Reiterando que, no teste utilizando o disco difusão, o extrato DB-E na concentração de 5.000 µg mL<sup>-1</sup> foi ativo contra *S. aureus* e *E. Coli*.

Frente a uma bactéria Gram negativa, novamente, deve ser considerado um resultado de importância clínica para posteriores estudos fitoquímicos bioguiados. Em relação aos outros extratos, testados nas referidas concentrações não apresentaram resposta frente a este micro-organismo.

Estes dados vão de encontro aos resultados obtidos por KUETE et al. (2012), pois estes autores encontraram atividade antibacteriana para duas cepas distintas de *E. coli*, AG100A e *E. coli* ATCC8739, sendo apresentado o menor valor de CIM para o extrato metanólico e suas frações na concentração de 16 µg mL<sup>-1</sup>.

A atividade apresentada pelo extrato bruto e suas frações frente aos micro-organismos testados, reforçam a hipótese de que *D. bulbifera* possa ser uma fonte potencial para drogas antimicrobianas. Portanto, estas análises podem ser utilizadas como estudo preliminar para selecionar amostras com potencial atividade contra micro-organismos que representem riscos à saúde pública, visto a resistência destes patógenos a alguns antimicrobianos existentes no mercado.

Já a determinação do CIM realizada para *C. albicans*, observa-se atividade antifúngica para os extratos DB-C e DB-A na concentração de 10.000 µg mL<sup>-1</sup> e ainda para o extrato DB-N na concentração de 5.000 µg mL<sup>-1</sup>. Esta atividade constitui-se relevante, ao expressar-se por meio de três extratos. Em relação aos outros extratos, DB-E, DB-W não apresentaram atividade antifúngica nas concentrações testadas frente a esta levedura.

Podemos considerar a relevância do particionamento do extrato bruto, pois, a partir dos extratos particionados, foi possível a observação de atividade

antimicrobiana frente a micro-organismos que não haviam demonstrado atividade, quando testados frente ao extrato bruto.

### 5.5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungistática Mínima (CFM)

Quanto ao resultado da atividade bactericida mínima CBM e atividade antifúngica mínima CFM dos extratos de *D. bulbifera*, que apresentaram atividade antimicrobiana quando testados pelo método CIM, pode-se relatar que em todos os extratos houve ação bacteriostática e fungistática, uma vez que houve crescimento de mais de uma colônia de bactérias e fungos nas placas, após o período de inoculação e em temperatura adequada para cada um destes micro-organismos. Dessa forma, os resultados obtidos nesta metodologia sugerem fortemente que a ação dos extratos testados seja bacteriostática e fungistática.

## 5.6 Análise antitumoral

### 5.6.1 Efeitos dos extratos de *D. bulbifera* sobre o crescimento de linhagens celulares de leucemia.

O efeito dos extratos de *D. bulbifera* sobre a proliferação de células Raji, K562, HL60 e Jurkat foi estudado pelo método MTT, e pode ser observado na Tabela 13.

**Tabela 13: Atividade antitumoral de  $CI_{50}$  para os extratos da *D. bulbifera*.**

Células Tumorais	DB-A $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-N $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-C $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-W $\mu\text{g mL}^{-1}$	VCR
<b>Raji</b>	19,60 $\pm$ 0,82	5,90 $\pm$ 0,89	23,20 $\pm$ 0,82	>100	0,01 $\pm$ 0,00
<b>K562</b>	37,50 $\pm$ 2,17	13,70 $\pm$ 1,16	33,70 $\pm$ 1,78	>100	0,50 $\pm$ 1,61 <sup>1</sup>
<b>HL60</b>	18,80 $\pm$ 0,32	5,70 $\pm$ 0,21	19,90 $\pm$ 0,71	>100	0,03 $\pm$ 0,01
<b>Jurkat</b>	12,10 $\pm$ 3,39	10,10 $\pm$ 0,20	18,70 $\pm$ 0,26	>100	0,01 $\pm$ 0,00

DB-E: Extrato etanólico, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-N: Extrato n-butanólico, DB-A: Extrato acetato de etila. Fonte: Autoria Própria.

Por meio da Tabela 13 é possível identificar a atividade dos extratos DB-A, DB-C, DB-W e também DB-N. Dentre as quatro amostras testadas, a que apresentou a atividade antitumoral mais expressiva foi a amostra DB-N, a qual necessitou da menor concentração para obter resultados de inibição de 50% da atividade celular ( $CI_{50}$ ) e entre todas as amostras de extratos testados, o DB-N, foi o extrato cuja atividade antitumoral mais se aproximou do controle positivo vincristina (VCR), fármaco com atividade antitumoral, capaz de induzir morte de células cancerígenas.

O extrato DB-W não apresentou atividade antitumoral contra as células testadas.

Quando analisado o extrato DB-A, vimos a necessidade de uma concentração de  $37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para obter resposta de inibição tumoral contra a linhagem K562 quando o controle apresentava atividade com  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para as linhagens HL60  $18,80 \mu\text{g mL}^{-1}$  (VCR  $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Raji  $19,60 \mu\text{g mL}^{-1}$  (VCR  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e Jurkat  $12,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (VCR  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Quando observado o extrato DB-C a concentração necessária para atingir a  $CI_{50}$  foi de  $33,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  contra a linhagem celular K562 ( $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de VCR), de  $29,90 \mu\text{g mL}^{-1}$  para linhagem HL60 ( $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de VCR), Raji  $23,20 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) enquanto que para linhagem celular Jurkat a concentração a  $CI_{50}$  foi de  $18,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  VCR).

A fração que obteve o melhor resultado, considerando a necessidade da menor concentração de extrato e também por ser a que mais aproximou-se do controle VCR, foi o extrato DB-N. Pode observar-se que contra a linhagem celular K562 foi necessário, concentração de  $13,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  para chegar a  $CI_{50}$  ( $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  VCR). Para a linhagem celular HL60, houve necessidade de  $5,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  para atingir a  $CI_{50}$  ( $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  VCR). Ao se analisar a Tabela 13, com a representação da linhagem celular Raji, observamos novamente a necessidade de  $5,90 \mu\text{g mL}^{-1}$  para alcançar a  $CI_{50}$  ( $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  VCR), e por fim, quando observado a linhagem celular Jurkat, o extrato DB-N necessitou de  $10,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  VCR).

Ao se utilizar a droga controle, há necessidade de pequenas quantidades para atingir níveis consideráveis de  $CI_{50}$ , no entanto, quando são utilizados extratos de plantas, sabe-se que os mesmos se constituem em uma mistura de

substâncias químicas distintas, com diferentes atividades, não apenas antitumorais. Dessa forma, as respostas assim obtidas, da atividade dos extratos frente a linhagens celulares tumorais, significam uma forma de triagem, de estudo bioguiado, possibilitando continuidade de pesquisa com alguns extratos.

Em estudos WANG et al. (2012), observaram a atividade antitumoral de extratos particionados de tubérculos de *D. bulbifera* em linhagens celulares S180 (Murino Sarcoma) e H22 (Hepato Carcinoma), semeadas intraperitonealmente em camundongos. O extrato que apresentou propriedade antitumoral, foi o extrato obtido a partir de etanol 80%, que foi administrado aos camundongos na concentração 200 mg kg<sup>-1</sup> para a linhagem celular S180. Pode-se assim correlacionar esta resposta (extrato etanólico 80%) com o extrato *n*-butanólico (DB-N), que apresentou atividade em uma concentração de 5,70 µg mL<sup>-1</sup> a 13,70 µg mL<sup>-1</sup> frente as linhagens celulares testadas.

Estes mesmos autores WANG et al. (2012), ainda trabalharam com extrato obtidos a partir da partição com acetato de etila, e observaram que este possuía ação em uma concentração de 40 mg kg<sup>-1</sup> promovendo inibição do crescimento do sarcoma S180 em proporção de 58,11% e para H22 em uma proporção de 22,83%. No presente estudo, a partição com acetato de etila (DB-A), promoveu a inibição do crescimento das linhagens celulares a partir da concentração de 12,10 µg mL<sup>-1</sup> contra as linhagens celulares Jurkat, 18,80 µg mL<sup>-1</sup> para HL60, 19,60 para Raji µg mL<sup>-1</sup> e para a linhagem K562, 37,50 µg mL<sup>-1</sup>. Nota-se que a concentração exigida destes extratos é pequena, sendo um fator importante a ser levado em consideração, pois estudos anteriores dos mesmos autores demonstraram que o extrato DB-A em doses altas poderia levar a lesões hepáticas, conferindo efeitos negativos quando este fosse aplicado clinicamente.

Já os autores CHEN et al. (2013), trabalharam com as propriedades antitumorais de extratos etanólicos da *D. bulbifera* em diferentes concentrações, frente a linhagem celular SGC-7901 (carcinoma gástrico), e observaram atividade de 50% de inibição do crescimento do carcinoma com extratos etanólicos 80% a partir da concentração 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. O valor da taxa de inibição aumentou para 62,3%, quando a concentração foi aumentada para 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. Ainda trabalharam com etanol a 70 e a 90%, porém os resultados dessas análises não foram tão eficazes como quando se utilizou etanol 80%. É

importante relatar também que o método de análise utilizado foi o mesmo do presente estudo (MTT).

Em estudos WANG et al. (2012) e CHEN et al. (2013) sugerem que a atividade antiproliferativa está associada a presença de Diosbulbina, que é uma lactona pertencente ao grupo dos diterpenóides clerodanos e constituem-se de forma abundante no rizoma de *D. bulbifera*, sendo a diosbulbina B a principal representante da classe.

Já nos estudos de GHOSH et al. (2012), que testaram as propriedades de nanopartículas bimetálicas platina-paládio sintetizadas utilizando *D. bulbifera*, frente a linhagem celular HELA (cancro epitelial do colo do útero humano) pelo método MTT. Estes autores observaram atividade antiproliferativa de até 74,25% com nanopartículas bimetálicas de platina e paládio, utilizando uma concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As nanopartículas são reconhecidas por aumentarem a atividade antitumoral e/ou a antioxidante dos compostos, desta forma, pode-se correlacionar a concentração citotóxica mínima obtida no presente estudo, foi de 5,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (DB-N) e as máxima de 37,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (DB-A) (com exceção do extrato DB-W, que não apresentou atividade por meio deste método) sugerindo assim que em estudo futuros a associação de partições de extratos da *D. bulbifera* e nanopartículas podem obter resultados ainda melhores na inibição de crescimento tumoral.

Os autores RIBEIRO et al. (2012), em estudos sobre a atividade citotóxica e pró-apoptótica dos extratos das folhas de *Arrabidaea chica*, a partir de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos frente a células leucêmicas humanas das linhagens Jurkat (leucemia linfóide), HL60 (leucemia mielóide), células estas, que compõe o presente estudo, e, demonstram que os extratos etanólicos foram os que apresentaram maior potencial citotóxico, enquanto que os extratos aquosos e o extrato metanólico não apresentaram atividade significativa contra as células estudadas. Os resultados desse trabalho assemelham-se aos aqui apresentados, utilizando *D. bulbifera*, uma vez que não se obteve ação considerável para o extrato aquoso, porém para o presente estudo o extrato alcoólico (DB-N), foi o que apresentou melhores resultados.

Já para os autores MOOI et al. (2010), em estudo com extratos metanólicos obtidos do tubérculo *Colusus tuberosus*, obtiveram atividade antitumoral significativa frente a linhagem celular Raji alcançando a  $CI_{50}$ , 7 mg

ml<sup>-1</sup> e 1 mg ml<sup>-1</sup> de dois compostos isolados deste tubérculo. Quando comparados aos valores obtidos no presente estudo, nota-se que a CI<sub>50</sub> do extrato DB-N é de 5,90 µg ml<sup>-1</sup> (0,0059 mg ml<sup>-1</sup>), DB-A 12,10 µg ml<sup>-1</sup> (0,0121 mg ml<sup>-1</sup>) DB-C 18,70 µg ml<sup>-1</sup> (0,0187 mg ml<sup>-1</sup>) podendo ser pontuada a atividade antitumoral expressiva obtida pelos extratos do tubérculo da *D. bulbifera*.

Ao trabalharem com extratos obtidos do tubérculo de *Cynanchum Auriculatum* por meio de extratos etanólicos e partições destes, SHAN et al. (2005) observaram atividade antitumoral destas amostras frente algumas linhagens celulares, dentre elas a K562, dentre a respostas obtidas está o extrato etanólico com o maior potencial citotóxico contra K562, representando potencial antitumoral com concentrações a partir de 1 µg ml<sup>-1</sup>. Já na fração clorofórmica, a ação antitumoral ocorreu na concentração de 100 µg ml<sup>-1</sup>, enquanto que, a fração obtida através do solvente *n*-butanol apresentou alta citotoxicidade contra o K562, em concentrações a partir de 1 µg ml<sup>-1</sup> até 100 µg ml<sup>-1</sup>.

Quando comparamos os resultados deste tubérculo aos obtidos pelos resultados da *D. bulbifera* apresentados neste estudo, podem ser correlacionadas semelhanças, diante do Extrato DB-C, a concentração mínima para obtenção da CI<sub>50</sub> foi de 18,70 µg ml<sup>-1</sup>, representando assim um melhor potencial antitumoral, pois, em concentrações menores do tubérculo citado anteriormente (100 µg ml<sup>-1</sup>) já observamos atividade. Quando analisada a fração DB-N a atividade antitumoral capaz de atingir a CI<sub>50</sub> ocorreu na concentração de 5,90 µg ml<sup>-1</sup>.

Estes resultados nos levam a afirmação da existência de compostos com potencial antitumoral presentes na *D. bulbifera*, bem como, que as amostras obtidas por meio das partições, proporcionaram o alcance destas substâncias, que no extrato bruto poderiam ter sofrido influência do *pool* de compostos presentes. Assim, futuros estudos bioquímicos podem ser realizados para determinação do(s) composto(s) responsável(is) pela ação antitumoral nestas amostras.

## 6 CONCLUSÕES

O particionamento em gradiente de polaridade dos extratos do tubérculo da *D. bulbifera* foi efetivo para extração de diferentes compostos, confirmando sua relevância ao considerar-se o tipo de análise que se deseja realizar.

Quanto ao rendimento da extração, pode-se observar resultado expressivo para o extrato aquoso (DB-W), podendo estar correlacionado aos resíduos vegetais, solúveis neste solvente, como o amido.

As análises de IV(TF), apontaram para a presença de bandas correspondentes ao grupamento OH, de alcanos, de carbonila e indicativos de compostos aromáticos. Dessa forma, justifica-se a presença, em maior ou menor quantidade, de compostos fenólicos e das potenciais atividades antioxidantes e estes podem ser utilizados em um trabalho bioguiado de isolamento, purificação e identificação de moléculas bioativas.

O relato acima, se justifica, uma vez que os extratos apresentaram resultado significativo de extração de CFT, além do que, as análises antioxidantes realizadas pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP, também apontaram para a presença de potenciais antioxidantes.

Por meio dos testes por disco difusão verificou-se que a amostra DB-E apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *S. aureus* e *E. coli*.

Para a análise de CIM, observou-se atividade do DB-E frente ao *S. aureus* na concentração de 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , DB-C frente a *S. aureus* e *C. albicans* na concentração de 10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , DB-N frente aos micro-organismos *S. aureus* e *C. albicans* (5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e frente a *E. coli*, *S. enterica* Typhimurium e *L. monocytogenes* (10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), para o extrato DB-A frente a *S. aureus* (10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *E. coli* e *C. albicans* (5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Quando realizada as análises, bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM), os resultados observados foram de ação bacteriostática e fungistática para todos os extratos bactérias e fungos respectivamente, que apresentaram atividade na análise de CIM.

Os extratos de *D. bulbifera*, testados frente as linhagens tumorais, exibiram atividades de  $CI_{50}$ . Diante da linhagem celular Raji foram DB-N, DB-A e DB-C, frente a K562 constituíram-se DB-N, DB-C e DB-A, para Jurkat DB-N, DB-A e DB-C, frente HL60 DB-N, DB-A e DB-C. Destaca-se o extrato DB-N, pois atingiu os valores de  $CI_{50}$ , utilizando o menor valor de concentração e apresentou atividade frente todas as linhagens celulares.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram importância científica, microbiológica e industrial do tubérculo de *D. bulbifera*, sugerindo possibilidade de prospecção por meio de testes de citotoxicidade dos extratos em fibroblastos, sobre hemácias, macrófagos, células renais e de fígado. Posterior identificação da molécula com potencial de ação, síntese em laboratório e a realização de estudos comparativos entre a droga sintética e a natural.

## 7 REFERÊNCIAS

ADELEYE, A.; IKOTUN, T. Antifungal activity of dihydrodioscorine extracted from a wild variety of *Dioscorea bulbifera* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 265-267, 1989.

ADEOSUN, O. M. et al. Antibacterial activities and phytochemical properties of extracts of *Dioscorea bulbifera* Linn ( Air Potatoe ) tubers and peels against some pathogenic bacteria. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 20–26, 2016.

AMPARO, T. R. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v.30, n.1, p.50-59, 2018.

ANDRADE, R. S. TAVARES, J. F DO NASCIMENTO, Y. M Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies da família annonaceae. 2017. 73f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ALMEIDA, H. W. B. Extração, caracterização estrutural parcial e atividades farmacológicas do alginato obtido da alga marrom *Lobophora variegata* (Lamouroux) Oliveira Filho, 1977. 2014.

ALMEIDA, M.; FERREIRA, C. E.; DUARTE, A. Utilization of cacti of the genus *Pereskia* in the human diet in a municipality of Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.751-756, 2012.

ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v.33, n.10, p.692-699, 2015.

ALVES, E. G., et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, n.31, v.5, p.1224-1229, 2008.

ANAZETTI, M. C.; QUIRÓS, N. M.; MELO, P. S. Avaliação de citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose em células de leucemia (HL60) pela dimetilamida-crotonina. 2003. 119f. (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica) – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 2003.

ANTONIOLLI, L. R., BENEDETTI, B. C.; DE SOUZA FILHO M. S.; BORGES, M. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'Pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005.

ARAUJO, E. I.M. MONTEIRO, L. C. C. F.; OLIVEIRA, A. M. S. D.; ALVES, L. A.; BERTINI, L. M. Caracterização da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Citrus sinensis* L. (Laranja). **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 276-282, 2015.

ATANASOV, A. G.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BAVELONI, F. G. et al. Estudo do potencial antitumoral de cordialina A em sistema nanoemulsionado para tratamento de linhagens celulares de tumor

cervical humano. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n.1, 2017.

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, 1996.

BIONDO, E.; FLECK, M.; KOLCHINSKI, E. M.; SANT’ANNA, V. POLES, R. G. Diversidade e potencial de utilização de plantas alimentícias não convencionais no Vale do Taquari, RS. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 4, n. 1, p. 61-90, 2018.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Manual de Hortaliças não convencionais– 2010.

BRESSAN, E. A.; VEASEY, E. A.; PERONI, N.; PEREZ FELIPIIM, A.; PACHECO DOS SANTOS, K. M. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter (IPGRI/FAO)**, p. 8-13, 2005.

CANDIDO, H. T.; RODRIGUES, J. P. A.; STURZA, J. A. I.; DA CRUZ BARBOSA, R. Teste de aceitação da salada de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) no

restaurante universitário da Universidade Federal de Mato Grosso – campus Rondonópolis. **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2, p. 1-7, 2017.

DELGADO-CAÑEDO, A. D.; NARDI, N. B.; CHIES, J. A. B. **Indução da síntese de hemoglobina em células K562 por doxorubicina e aclarrubicina: em busca de um mecanismo em comum**, 36 f., 2005. Artigo apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2005.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista virtual de Química**, v. 9, n. 2, 2017.

CASTRO, A. P.; FRAXE, T. J. P.; PEREIRA H. S.; KINUPP, V. F. Etnobotânica das variedades locais do cará (*Dioscorea spp.*) cultivados em comunidades no município de Caapiranga, estado do Amazonas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 658-667, 2012.

CASTRO-LÓPEZ, C.; JANETH, M.; V. S.M. D.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D.; ROJAS, R.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILAR, N. C. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 237, n. 15, p. 1139-1148, 2017.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANIAD, P.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; PIANWANIT, S.; TEWTRAKUL, S. Anti-HIV-1 integrase compounds from *Dioscorea bulbifera* and molecular docking study. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 6, p. 1077-1085, 2016.

CHEN, X. WU S. H., ZENG X. B.; JIANG, X. W.; CHEN, X. P.; YUAN, J. LU, B. H.; LI, J. Antioxidant and SGC-7901 cell inhibition activities of *rhizome dioscorea bulbifera*. Ethanol extract . **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 5, p. 261-266, 2013.

CHIMIN, A. Isolamento e purificação de compostos ativo. Disponível em: <http://www.uepg.br/fitofar/dados/isolapurificativo.pdf>. Acesso em :10/03/2019.

CONDE, B. E.; MACEDO, A. L.; FONSECA A. S.; SIQUEIRA A. M.; SOUZA G. H. L.; MARTINS, A. E.; ROGÉRIO, T. S. Estudo crítico sobre utilização de fitoterápicos por praticantes de exercício físico em academias de musculação. **Biológicas & Saúde**, v. 5, n. 16, p.33-47, 2015.

CÓRDOBA, M. M. Avaliação da atividade citotóxica in vitro dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) RM King & H. Rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) RM King sobre células tumorais Jurkat. 2017. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, 2017.

CUI, H. L., T.; Wang, L.; Su, Y.; Xian, C. J. *Dioscorea bulbifera* polysaccharide and cyclophosphamide combination enhances anti-cervical cancer effect and attenuates immunosuppression and oxidative stress in mice. **Scientific reports**, v. 6, p. 19185, 2016.

DA SILVA SILVEIRA, L. M.; OLEA, R. S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, p. 2, 2009.

DE SOUSA BARBOSA, B. et al. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

FERREIRA, A. B.; MING, L. C.; CHECHETTO, F.; PINTO, R. A. Dioscoreáceas cultivadas por agricultores da Baixada Cuiabana em Mato Grosso–Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, n. 1, p. 201-208, 2010.

FERREIRA, C. D.; BRITO, D. R. S.; LUCENA, D. S.; ARAÚJO, J. M.; SALES, F. C. V. Uso medicinal de plantas pela comunidade do bairro Nova Conquista (multirão) – Patos – PB. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p. 376-382, 2017.

GAN, R. Y. et al. Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 5988-5997, 2010.

GAO, H., KUROYANAGI, M.; WU, L.; KAWAHARA, N.; YASUNO, T.; NAKAMURA, Y.; Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1241-1243, 2002.

GASPAR, E. B. MINHO, A. P.; DOMINGUES, R.; SILVA K. C. Comparação de métodos para a avaliação in vitro de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Embrapa Pecuária Sul-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2017.

GHOSH, S.; PARIHAR, V., S.; MORE, P.; DHAVALA, D. D.; CHOPADEV, B. Phytochemistry and therapeutic potential of medicinal plant: *Dioscorea bulbifera*. **Medchem**, v. 5, n. 4, p. 154-159, 2015.

GHOSH, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. **International Journal Nanomedicine**. v. 7, p. 483-496, 2012.

GONÇALVES, O.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F.; MENDO, S.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 1, p. 18-25, 2011.

GONZÁLEZ VEGA, M. E. El Ñame (*Dioscorea spp.*). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importância em el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales**, v. 33, n. 4, p. 05-15, 2012.

GUAN, X. R.; ZHU, L.; XIAO, Z. G.; ZHANG, Y. L.; CHEN, H. B.; YI, T. Bioactivity, toxicity and detoxification assessment of *Dioscorea bulbifera* L.: A comprehensive review. **Phytochemistry Reviews**, v 16, n. 3, p. 1-29, 2017.

HU, J.; MA, Y.; SONG, Y. Preliminary study on antibacterial action of decoction of *Dioscorea bulbifera* L. *in vitro*. **Heilongjiang Medicine Journal**, n. 20, p. 13–15, 2007.

JAYACHANDRAN, K. S.; VASANTHI, A. H. R.; GURUSAMY, N. Steroidal saponin diosgenin from *Dioscorea bulbifera* protects cardiac cells from hypoxia-

reoxygenation injury through modulation of pro-survival and pro-death molecules. **Pharmacognosy magazine**, v.12, n.1, p.14, 2016.

JIMÉNEZ-MONTERO, M.; MARTÍNEZ A. Evaluacion morfoagronomica de la Papa de aire (*Dioscorea bulbifera* L.) en Panama. **Cultivos Tropicales**, v. 37, n. 1, p. 14-21 2016.

JORGE, A.O.C. Microbiologia: atividades práticas. 1. ed. São Paulo: Santos, 1997.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231–235, 2003.

KARPOVA, M. B. et al. Raji revisited Cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. **Leukemia**, v.19, n. 1, p. 159 - 161, 2005.

KAYODE, R. M. et al. Physicochemical Properties of Processed Aerial Yam (*Dioscorea bulbifera*) and Sensory Properties of Paste (Amala) Prepared with Cassava Flour. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, n. 2, p. 84-94, 2017.

KUETE, V. et al. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 228, 2012.

LI, S. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 289-298, 2013.

LIU, H. et al. Norclerodane diterpenoids from rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 10, p. 1174-1180, 2010.

MACHADO, V. S.; FARIA, R. C.; ALVES, J. A. A.; ASCHERI, D. P. R. Comparação da espessura, solubilidade e testes mecânicos em filmes biodegradáveis: Efeito do glicerol e amido. In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE) (ISSN 2447-8687)**. 2016.

MARANDI, R. R.; BRITTO, S. J.; GEORGE, M.; MINJ, E. Pharmacognostic, fluorescent, antibacterial and phytochemical analysis of tuber of *Dioscorea bulbifera* L. from Jharkhand. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 8, 2016.

MARTINS, A. K. A.; BOAVENTURA, M. F. C.; LIMA, M. M. R. Cultivo de linhagens permanentes. In: PERES, C. M.; CURI, R. Como Cultivar Células. 1 ed. São Paulo: Guanabara, 2005. cap 9, p. 46.

MCMURRY, J. Química Orgânica, Ed. **Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro**, 2010.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração. 2005. 2018f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MESQUITA, A. S. Inhame- *Dioscorea cayannensis* Lam.-e taro – *Colocasia esculenta* (L.) Schott – Cenários dos mercados brasileiros e internacional. In: **Simpósio Nacional sobre a cultura do inhame e taro. Joao Pessoa, PB. Anais. Joao Pessoa: EMEPA- PB**, v. 1, p. 215-238, 2002.

MIRANDA, J. A. L. et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v. 17, n. 4, p. 1142-1149, 2015.

MOOI, L. Y. et al. Chemopreventive properties of phytosterols and maslinic acid extracted from *Coleus tuberosus* in inhibiting the expression of EBV early-antigen in Raji cells. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 5, p. 1267-1275, 2010.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

OKIGBO, R. N.; ANUAGASI, C. L.; AMADI, J. E.; UKPABI U.;J. Potential inhibitory effects of some African tuberous plant extracts on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal Integrative Biology**, v. 6, n. 2, p. 91-98, 2009.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAVA, C. N. R.; SANABRIA, A. G. Z.; LEAL, L. C. S. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. **Nova**, v. 15, n. 27, p. 119-129, 2017.

PEDRALLI, G.; CARMO, C. A.; CEREDA, M.; PUIATTI, M. Uso de nomes populares para as espécies de *Araceae* e *Dioscoreaceae* no Brasil. **Horticultura Brasileira**, p. 530-532, 2002.

PIRES, J.; TORRES, P. B.DOS SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteau para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.

PONCE, G; CANTÚ, P. C., FLORES, A. BADI, M.; BARRAGÁN, A., ZAPATA, R. FERNÁNDEZI. Cucarachas: Biología e importancia em salud pública. **Respyn Revista de Salud Pública y Nutrición**, v. 6, n. 3, 2005.

PRAKASH, O. M.; KUMAR, A.; KUMAR, P. Anticancer potential of plants and natural products: a review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 104-115, 2013.

QUEIROZ, C. R. A. A.; FERREIRA, L.; GOMES, L., B., P.; MELO, C. M.T.; ANDRADE, R., R. Ora-pro-nóbis em uso alimentar humano: percepção sensorial. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 01-05, 2015.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, n. 1-2, p. 53-65. 2004.

RABANAL, R. M. et al. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 287–292, 2002.

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.

REIS, S. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antimicrobiana de extratos de *Plectranthus grandis* (L. H. Cramer) *R. Willemse* (Boldo) e *Aloe vera* (Linnaeus) *Burm* (Babosa) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Biociências**, v. 22, n. 1, p. 39-47, 2016.

RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 364-373, 2012.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 1, p. 51–62, 2004.

ROCHA, D. R. C. et al. SANTOS Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pelo Método De Redução Do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico 125, **Embrapa** - Fortaleza, CE, 2006.

SANTOS, E. S. Inhame (*Dioscorea spp.*): Aspectos básicos da cultura. João Pessoa, **EMEPA-PB, SEBRAE**. 150p. 1996.

SANTOS, E. S.; MACEDO, L. S. Tendência e perspectiva da cultura inhame (*Dioscorea spp*) no Nordeste do Brasil. In. **Simpósio Nacional (sobre as culturas de inhame e taro, 2)**. Anais. João Pessoa: EMEPA-PB. v.1, p.19-32., 2002.

SANTOS, G. J. L.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.3, p.494-509, 2016.

SANTOS, M. C.; RIBEIRO, M. Bactérias de relevância clínica e seus mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, 2016.

SANTOS, G. J. L.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 3, p. 494-509, 2016.

SAVI, A. Caracterização química, potencial antimicrobiano e antioxidante de polissacarídeo extraído de cará-moela (*Dioscorea bulbifera*). 2018. 80f Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

SHAN, L. et al. Antitumor activity of crude extract and fractions from root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 3, p. 259-261, 2005.

SHARMA, M. et al. Purification, characterization and biological significance of mannose binding lectin from *Dioscorea bulbifera* bulbils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1146-1155, 2017.

SILVA, D. M. **Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites**. 2013. 94f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. D. S. S.; KOBLITZ, M. G. B. Phenolic Compounds, Carotenoids And Antioxidant Activity In Plant Products. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 2006.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–179, 1999.

SONG, F. L. et al. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2362-2372, 2010.

SOUSA, I. J. O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista Uningá Review**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2017.

SOUZA, A. V.; BERTONI, W. B.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation of *Dioscorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

SOUZA, C. A. S. et al. Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, p. 1-8, 2017.

SOUZA, L. J. A investigação do conhecimento e uso de plantas medicinais na região do distrito de Prata, distrito de Monte Alegre Goiás, 2015.

SOUZA-SEVALHO, E.; ROCHA, W. C. Potencial antioxidante dos diferentes extratos de *Morinda citrifolia* por TLC-DPPH•. **Conexão Ciência (Online)**, v.12, n. 1, p. 72-77, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

STEHMANN, J. R. & SOBRAL, M. 2017. Biodiversidade no Brasil. pp. 1-10. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre, Artmed, 2016.

SUBASINI, U.; THENMOZHI, S.; VARGHESE, A.; VARADHARAJU, S.; RAJAMANICKAM, G. V.; DUBEY, G. P. Safety Profile, Standardization and HPTLC Fingerprint Analysis of *Dioscorea bulbifera* Linn **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, n. 6, v. 6, p. 21–26, 2015.

TAPONDJOU, L. A.; JENETT-SIEMS, K.; BÖTTGER, S.; MELZIG, M. F. Steroidal saponins from the flowers of *Dioscorea bulbifera* var. *sativa*. **Phytochemistry**, v. 95, p. 341–350, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8° ed. Artmed Editora, 2005.

TEPONNO, R. B.; TAPONDJOU, A. L.; GATSING, J.; DJOUKENG, D.; ABOUMANSOUR E.; TABACCHI, R.; TANE P.; EVANS, S.; LONTSI, D. Bafoudiosbulbins A, and B, two anti-salmonella clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1957-1963, 2006.

VEASEY, E. A. et al. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa. Recife: NUPEEA**, v.1, p.45-74, 2010.

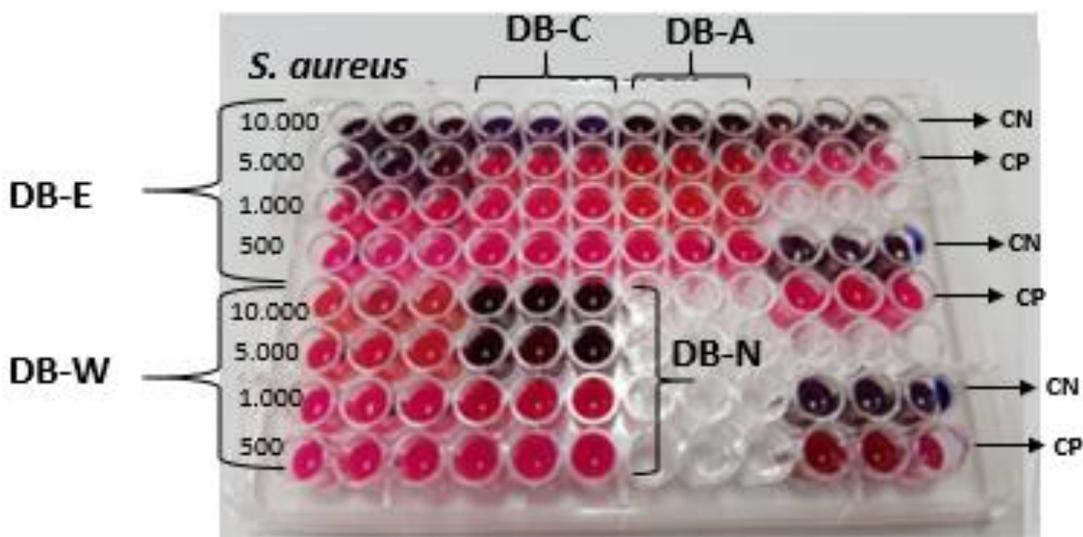
VIANA, M.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C.; PEREIRA, S. M.; OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, M. L. Phytochemical composition and antioxidante potential of unconventional vegetables. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 504-509, 2015.

WANG, J. M.; JI, L. L.; BRANFORD-WHITE, C. J.; WANG, Z. Y.; SHEN, K. K.; LIU, H.; WANG, Z. T. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome *in vivo*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 388–394, 2012.

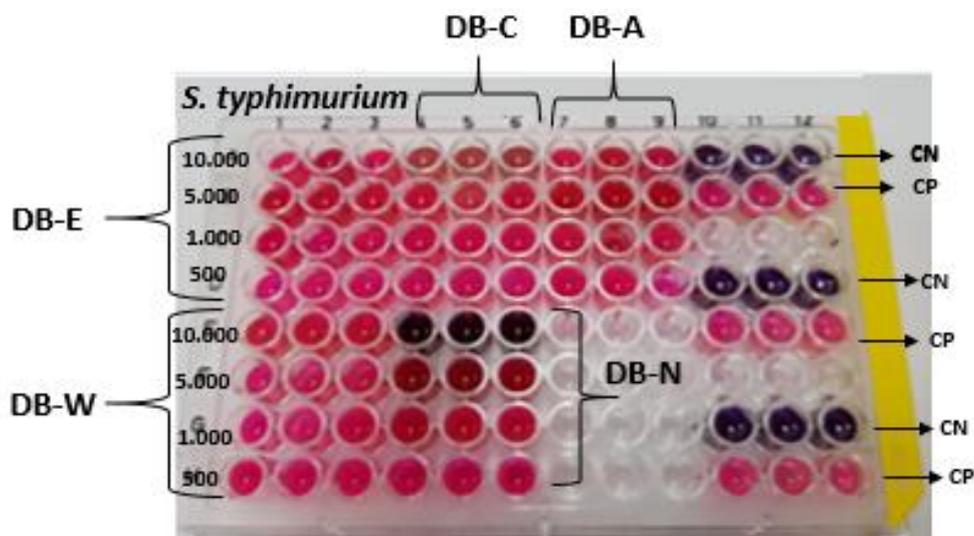
ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of 652 sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during 653 accelerated storage. **Food Chemistry**, 118, 656-662, 2010.

## 8 APÊNDICES

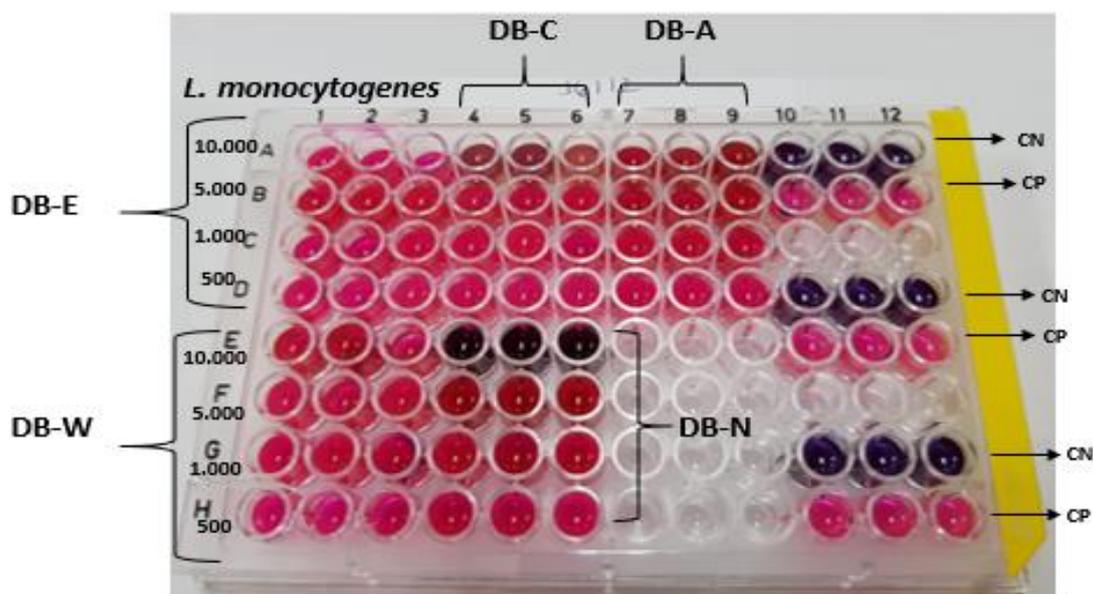
Apêndice A – CIM dos extratos de *D. bulbifera* testados frente ao *S. aureus*. Onde DB-A (Extrato acetato de etila), DB-C (Extrato clorofórmico), DB-E (Extrato etanólico) DB-W (Extrato aquoso), DB-N (Extrato *n*-butanólico), CN: Controle negativo 1° e 4° linha, colunas I, J, K com tetraciclina 5.000 µg mL<sup>-1</sup>, CN: Controle negativo 7° linha, colunas I, J, K com DMSO 10%, CP: Controle positivo com água peptonada linhas 2, 5, 8 colunas I, J, K.



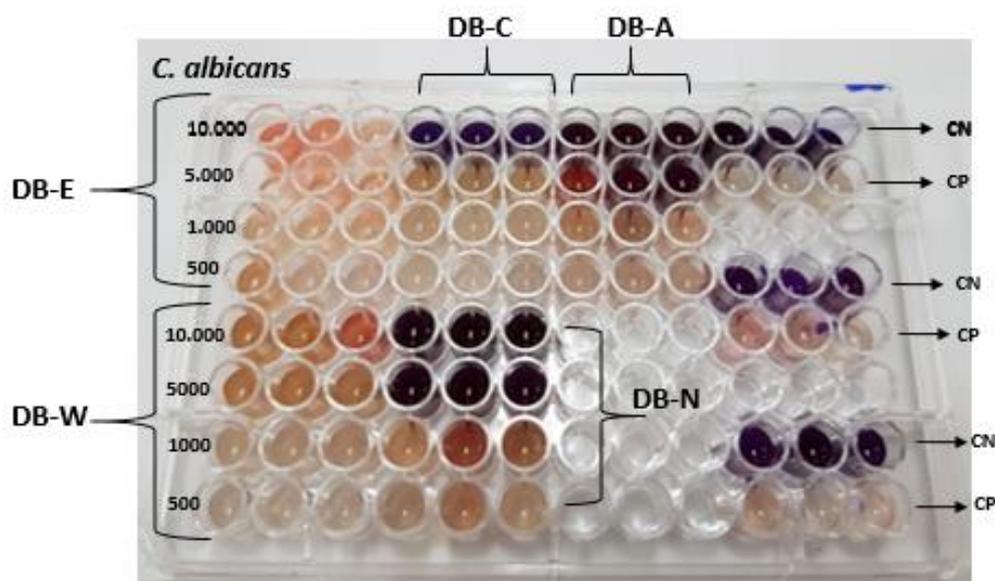
Apêndice B – CIM dos extratos de *D. bulbifera* testados frente ao *S. entérica* Typhimurium. Onde: DB-A (Extrato acetato de etila), DB-C (Extrato clorofórmico), DB-E (Extrato etanólico) DB-W (Extrato aquoso), DB-N (Extrato *n*-butanólico), CN: Controle negativo 1° e 4° linha, colunas I, J, K com tetraciclina 5.000 µg mL<sup>-1</sup>, CN: Controle negativo 7° linha, colunas I, J, K com DMSO 10%, CP: Controle positivo com água peptonada linhas 2, 5, 8 colunas I, J, K.



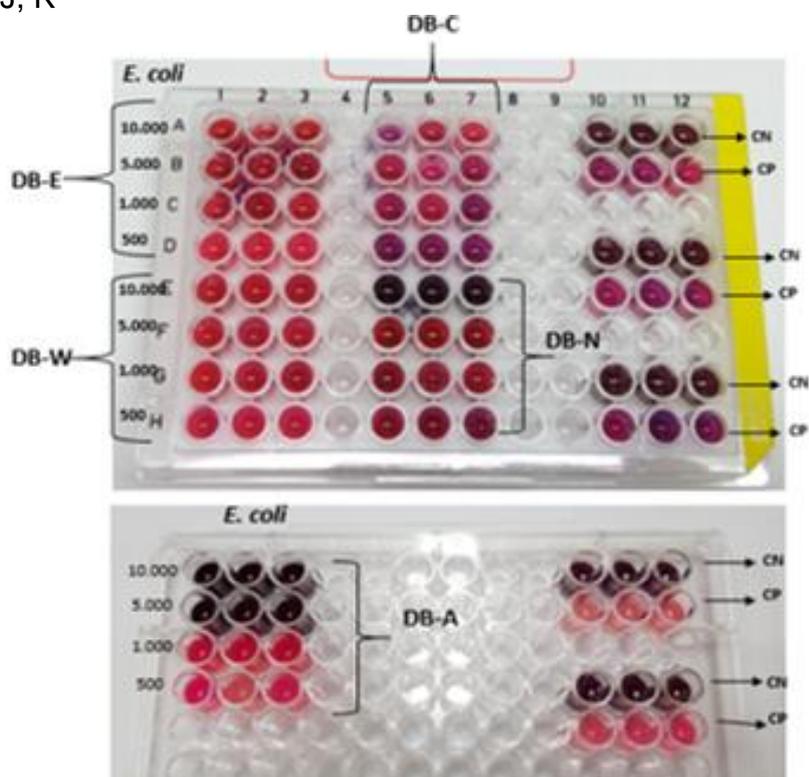
Apêndice C – Resultado da concentração inibitória mínima dos extratos de *D. bulbifera* testados frente ao *L. monocytogenes*. Onde: DB-A (Extrato acetato de etila), DB-C (Extrato clorofórmico), DB-E (Extrato etanólico) DB-W (Extrato aquoso), DB-N (Extrato n-butanólico), CN: Controle negativo 1° e 4° linha, colunas I, J, K com tetraciclina 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , CN: Controle negativo 7° linha, colunas I, J, K com DMSO 10%, CP: Controle positivo com água peptonada linhas 2, 5, 8 colunas I, J, K.



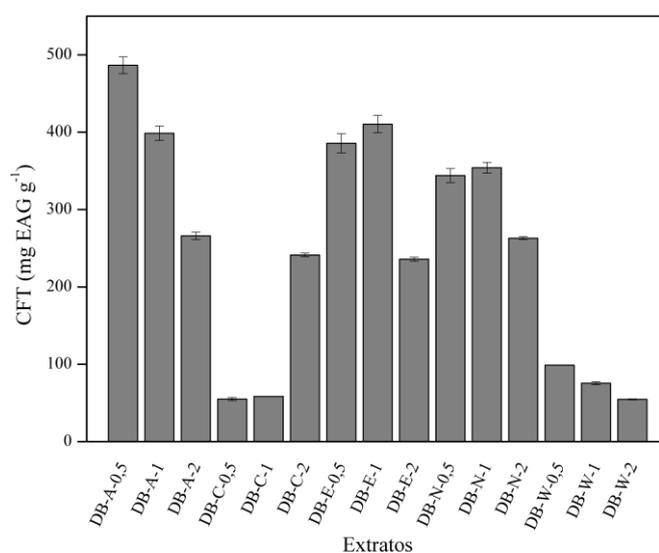
Apêndice D – Resultado da concentração inibitória mínima dos extratos de *D. bulbifera* testados frente ao *C. albicans*. Onde: DB-A (Extrato acetato de etila), DB-C (Extrato clorofórmico), DB-E (Extrato etanólico) DB-W (Extrato aquoso), DB-N (Extrato n-butanólico), CN: Controle negativo 1° e 4° linha, colunas I, J, K com fluconazol 5mg  $\text{mL}^{-1}$ , CN: Controle negativo 7° linha, colunas I, J, K com DMSO 10%, CP: Controle positivo com água peptonada linhas 2, 5, 8 colunas I, J, K.



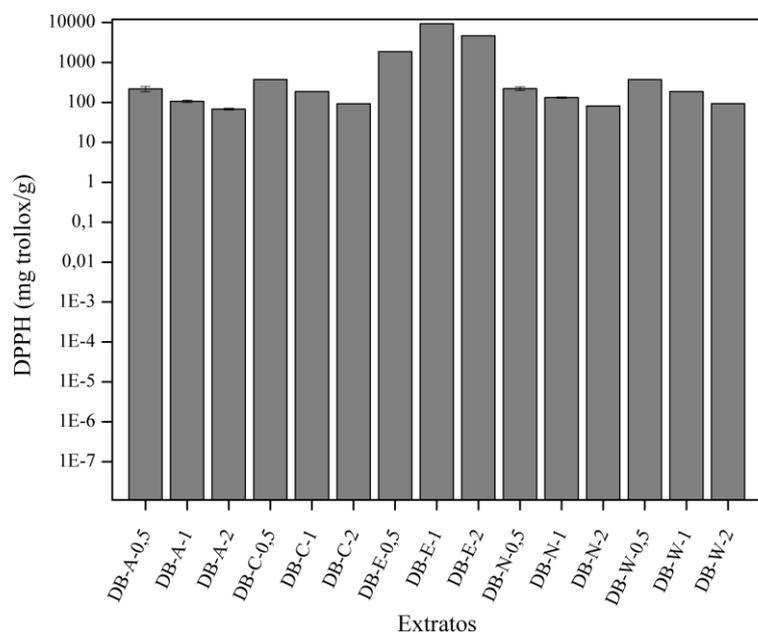
Apêndice E – Resultado da concentração inibitória mínima dos extratos de *D. bulbifera* testados frente ao *E. coli*. Onde: DB-A (Extrato acetato de etila), DB-C (Extrato clorofórmico), DB-E (Extrato etanólico) DB-W (Extrato aquoso), DB-N (Extrato *n*-butanólico), CN: Controle negativo 1° e 4° linha, colunas I, J, K com tetraciclina 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , CP: Controle Negativo 7° linha, colunas I, J, K com DMSO 10%, CP: Controle positivo com água peptonada linhas 2°, 5° e 8° linha colunas I, J, K



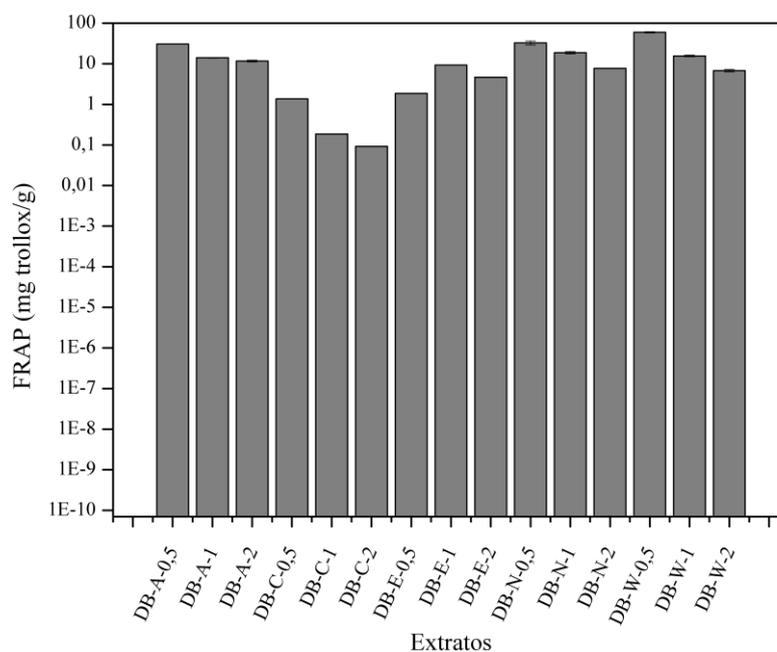
Apêndice F – Efeito do solvente e da concentração na extração de fenólicos totais. DB-A: Extrato acetato de etila, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-E: Extrato etanólico bruto. DB-N: Extrato *n*-Butanol. DB-W: Extrato aquoso. Extratos testados nas concentrações de: 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ , 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .



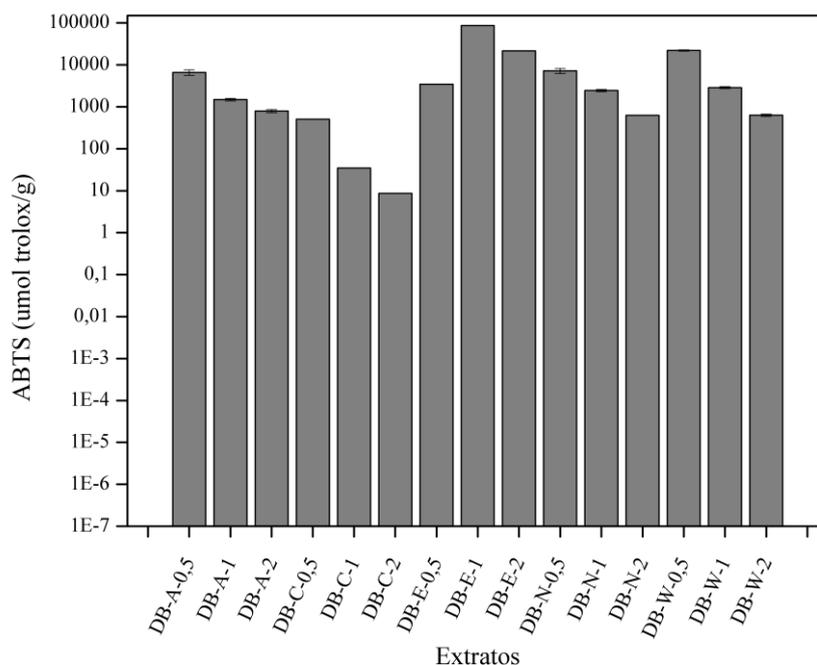
Apêndice G – Efeito do solvente e concentração na estabilização do radical DPPH. DB-A: Extrato acetato de etila, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-E: Extrato etanólico bruto. DB-N: Extrato *n*-Butanol. DB-W: Extrato aquoso. Extratos testados nas concentrações de: 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, 2,0 mg mL<sup>-1</sup>.



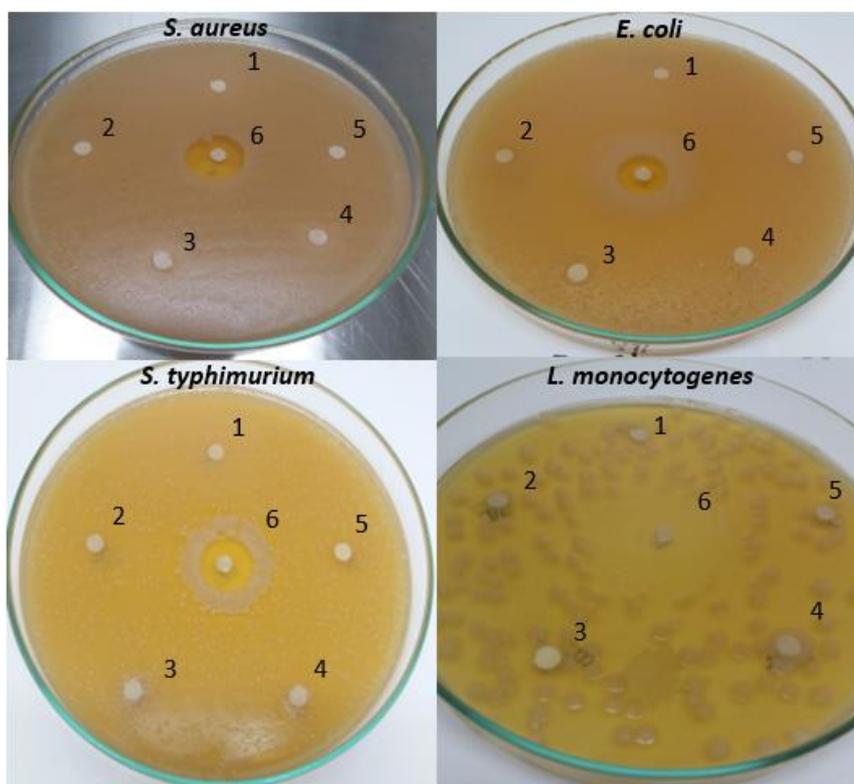
Apêndice H – Efeito do solvente e concentração na redução do íon férrico. DB-A: Extrato acetato de etila, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-E: Extrato etanólico bruto. DB-N: Extrato *n*-Butanol. DB-W: Extrato aquoso. Extratos testados nas concentrações de: 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, 2,0 mg mL<sup>-1</sup>.



Apêndice I – Efeito do solvente e concentração na captura do radical ABTS. DB-A: Extrato acetato de etila, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-E: Extrato etanólico bruto. DB-N: Extrato *n*-Butanol. DB-W: Extrato aquoso. Extratos testados nas concentrações de: 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. Fonte: autoria própria.



Apêndice J – Resultado obtido por disco difusão utilizando o extrato DB-E frente as bactérias. Disco 1: Controle com água peptonada; Disco 2: DB-E 10.000 µg mL<sup>-1</sup>; Disco 3: DB-E 5.000 µg mL<sup>-1</sup>; Disco 4: DB-E 1.000 µg mL<sup>-1</sup>. Disco 5: DB-E 500 µg mL<sup>-1</sup>; Disco 6: Controle negativo; Tetraciclina 5.000 µg mL<sup>-1</sup>



Apêndice K: Resultado obtido por disco difusão utilizando o extrato DB-E frente *C. albicans*. Disco 1: Controle com água peptonada; Disco 2: DB-E 10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Disco 3: DB-E 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Disco 4: DB-E 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Disco 5: DB-E 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Disco 6: Controle negativo; Fluconazol 5.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$

