

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS
BIOATIVOS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DA
DIOSCOREA ALATA
(*DIOSCOREACEAE*)**

Luciméri P. Machado Magalhães

Recife, 2004

Luciméri P. Machado Magalhães

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA *DIOSCOREA ALATA*
(*DIOSCOREACEAE*)**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.**

**Área de Concentração: Química de Produtos Bioativos
Orientadora: Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti
de Albuquerque.**

Recife, 2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR LUCIMÉRI PAULINO MACHADO MAGALHÃES AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 26 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. JULIANNA FERREIRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dra. MARIA TERESA JANSEM DE ALMEIDA CATANHO
Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE


Dra. NONETE BARBOSA GUERRA
Departamento de Nutrição - UFPE

Magalhães, Luciméri P. Machado

Estudo fitoquímico e biológico das folhas da *Dioscorea Alata* (*Dioscoreaceae*) / Luciméri P. Machado Magalhães. – Recife: O Autor, 2004.

73 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Química de compostos bioativos – Plantas medicinais 2. *Dioscoreaceae* – Análise fitoquímico e biológico 3. *Dioscorea Alata* (inhame água) – Estudo antiinflamatório e antitumoral I. Título.

**615.33
615.32**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008-005**

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha mãe,
Josméri Paulino Machado que muito
me incentivou no andamento desta
dissertação.
Ao meu marido Adriano Magalhães
A minha filha Adriana.

AGRADECIMENTOS

À Minha Orientadora Prfa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque pela dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho científico.

As professoras Dra. Alda de Andrade Chiappeta e Dra. Silene Carneiro de Nascimento por terem aceito fazer parte da banca de leitura, contribuindo na correção deste trabalho.

A prof. Dra. Alda de Andrade Chiappeta e profa. Kêsia da Fonseca Ribeiro de Sena, pela orientação na realização dos testes microbiológicos.

A prof. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho, por ter me ajudado na construção dos gráficos dos testes radiofarmacológicos.

A Grace Mary de Souza pela orientação nos testes de marcação com tecnécio-99m.

Aos estagiários do Departamento de Biofísica e Radiologia, Jailsom, Marília e Edgard pela ajuda nos testes de marcação com tecnécio-99m.

A estagiária Érika Valente de Medeiros, pela ajuda na realização nos testes microbiológicos.

A estagiária e prima Giuseppina Fucale Magalhães, pela ajuda na realização das colunas cromatográficas.

A Omar Martins de Oliveira pela boa vontade e pela ajuda nos testes de prospecção dos constituintes químicos.

Ao prof. Sebastião Camilo do Departamento de Nutrição, pela realização dos testes nutricionais

A todos os funcionários que me auxiliaram no que foi possível.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO.....	01
2 – OBJETIVOS.....	03
2.1 – Objetivo geral.....	03
2.2 – Objetivo específico.....	03
3 – REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1. Constituintes Químicos.....	09
4 - MATERIAL E MÉTODO	
4.1 – AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA.....	20
4.1.1 – Obtenção dos extratos.....	20
4.1.2 – Determinação da atividade antimicrobiana.....	20
4.1.3 - Microrganismos-teste.....	20
4.1.4 - Meios de cultura.....	23
4.1.4.1 - Meios para realização dos testes de atividade.....	23
4.1.4.2 - Meios para manutenção de microrganismos.....	23
4.1.5 - Padronização dos inóculos.....	23
4.1.6 - Semeio.....	24
4.1.7 - Teste de difusão em disco.....	24

4.1.8 - Determinação da concentração mínima inibitória.....	24
4.2 - AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	26
4.2.1 – Determinação de umidade e substâncias voláteis.....	26
4.2.2 - Determinação de cinzas.....	26
4.2.3 - Determinação de proteínas.....	26
4.2.4 - Determinação de lipídeos.....	27
4.2.5 - Determinação de carboidratos.....	27
4.2.6 - Determinação do valor calórico total.....	27
4.2.7 - Determinação de fósforo.....	28
4.2.8 - Determinação de ferro.....	29
4.2.9 - Determinação de fibra alimentar enzimática.....	29
4.2.10 - Determinação de sódio e potássio.....	30
4.3 – ESTUDO RADIOFARMACOLÓGICO.....	31
4.3.1 - ESTUDO RADIOFARMACOLÓGICO: ESTUDO DA ANÁLISE DE MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99M E ANTIOXIDANTE.....	31
4.4 – ESTUDO CITOTÓXICO.....	32
4.4.1 – Determinação da atividade citotóxica.....	32
4.5 - ESTUDO FITOQUÍMICO.....	34
4.5.1 - Coleta do material botânico.....	34
4.5.2 - Estudo fitoquímico (prospecção de constituintes químicos).....	34
4.5.2.1 - Testes para heterosídeos cianogênicos.....	34
4.5.2.2 - Prospecção dos constituintes do extrato hidroalcoólico.....	35
4.5.2.3 - Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	35
4.5.2.4 - Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	36

4.5.2.5 - Testes para confirmação de catequinas.....	36
4.5.2.6 - Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	37
4.5.2.7 - Testes para esteróides e triterpenóides.....	37
4.5.2.8 - Testes para saponinas.....	37
4.5.2.9 - Teste confirmatório para saponinas.....	38
4.5.3 - Testes para alcalóides.....	38
4.5.3.1 - Testes para bases quaternárias.....	38
4.5.3.2 - Prospecção dos constituintes para o extrato clorofómico.....	39
4.5.3.3 - Testes para alcalóides.....	39
4.5.3.4 - Testes para bases quaternárias.....	39
4.6 – ESTUDO QUÍMICO.....	40
4.6.1 – Obtenção dos extratos.....	40
4.6.2 – Separação cromatográfica do extrato hexânico.....	40
4.6.3 – Separação cromatográfica das frações F5 a F7 do extrato hexânico.....	40
4.6.4 – Reação de acetilação do anidrido acético e piridina.....	44
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	
5.1 - Estudo Microbiológico.....	45
5.1.1 – Teste de atividade antimicrobiana.....	45
5.1.2 - Determinação da concentração mínima inibitória.....	46
5.2 – Estudo Nutricional.....	47
5.3 – Estudo Radiofarmacológico.....	50
5.3.1 – Extrato hidroalcoólico.....	50
5.3.2 – Frações solúveis do plasma e hemácia no extrato hidroalcoólico.....	50

5.3.3 – Frações insolúveis do plasma e da hemácia no extrato hidroalcoólico.....	51
5.3.4 – Extrato clorofórmico.....	52
5.3.5 – Frações insolúveis do plasma e da hemácia no extrato clorofórmico.....	52
5.3.6 – Frações solúveis do plasma e da hemácia no extrato clorofórmico.....	53
5.4 – Estudo citotóxico.....	54
5.5 – Estudo Fitoquímico.....	55
5.5.1 – Abordagem fitoquímica para o extrato clorofórmico.....	55
5.5.1.2 – Teste para heterosídeos cianogênicos.....	55
5.5.1.3 – Prospecção dos constituintes do extrato hidroalcoólico.....	55
5.5.1.4 - Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	55
5.5.1.5 - Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	55
5.5.1.6 - Testes para confirmação de catequinas.....	56
5.5.1.7 - Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	56
5.5.1.8 - Testes para esteróides e triterpenóides.....	56
5.5.1.9 - Testes para saponinas.....	57
5.5.2 - Teste confirmatório para saponinas.....	57
5.5.2.1 - Testes para alcalóides.....	57
5.5.2.2 - Testes para bases quaternárias.....	57
5.6 – ESTUDO QUÍMICO.....	59
6 – CONCLUSÕES.....	60
7 – REFERÊNCIAS BOBLOGRÁFICAS.....	61
8 – ANEXOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama do esquema de extração.....	42
FIGURA 2– Diagrama da separação cromatográfica.....	43
FIGURA 3 – Gráfico do extrato hidroalcoólico da <i>Dioscorea alata</i> nas células totais com TC-99m.....	50
FIGURA 4 – Gráfico do efeito da captação de tecnécio-99m do extrato hidroalcoólico da <i>Dioscorea alata</i> referente a fração solúvel.....	51
FIGURA 5 – Gráfico do efeito da captação de tecnécio-99m do extrato hidroalcoólico da <i>Dioscorea alata</i> da fração insolúvel do sangue.....	51
FIGURA 6 – Gráfico do efeito da captação de tecnécio –99m do extrato clorofómico da <i>Dioscorea alata</i> das células totais do sangue.....	52
FIGURA 7 – Gráfico do efeito da captação de tecnécio-99m da fração	

insolúvel do extrato clorofórmico da
Dioscorea alata.....53

FIGURA 8 – Gráfico do efeito da captação de tecnécio-99m da fração
solúvel do extrato clorofórmico da
Dioscorea alata.....53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condições de crescimento dos microrganismos-teste utilizados.....	22
TABELA 2 – Concentração dos extratos nas diferentes alíquotas testadas na determinação da CMI.....	25
TABELA 3 – Representação da nomenclatura para determinação do valor Calórico total.....	28
TABELA 4 –Observação de cores para os testes de antocianinas, Antocianidinas e flavonóides.....	35
TABELA 5 –Observação de cores para os testes de leucoantocianidinas, Catequinas e flavononas.....	36
TABELA 6 – Atividade antimicrobiana de extratos brutos das folhas de <i>Dioscorea Alata</i> (halo de inibição em mm).....	46

TABELA 7 – Análise da composição nutricional das folhas *Dioscorea alata*.....48

TABELA 8 – Dados comparativos da análise nutricional das folhas da
Dioscorea alata com dados do tubérculo.....49

TABELA 9 – Atividade citotóxica dos extratos hidroalcoólico e
Clorofórmico das folhas da *Dioscorea alata* frente as células
Hep-2 e NCI-H 292.....54

TABELA10 – Classe de compostos de extratos brutos das folhas da *Dioscorea*
alata.....58

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DA DIOSCOREA ALATA (DIOSCOREACEAE)

RESUMO

O gênero *Dioscorea* é o mais importante da família Dioscoreaceae, apresentando cerca de 600 espécies. Entre estas apenas cinco são consideradas importantes na alimentação humana e animal: *Dioscorea cyenensis*, *Dioscorea.alata*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea esculenta* e *Dioscorea trifida*. A *Dioscorea. Alata* (inhame água), originária do Sudeste da Ásia, cultivada nos trópico, é uma espécie com propriedades medicinais, além de antifúngica apresenta propriedades farmacológicas com poder desintoxicante e depurativo. Folhas foram extraídas com solventes objetivando identificar os princípios ativos encontrados, estudar a atividade antimicrobiana, citotóxica e antioxidante. Diferentes extratos foram submetidos ao screen de dez microrganismos, apresentando atividade nos extratos hidroalcoólico e clorofórmico, para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Ácido-Álcool Resistente, Leveduras e Fungos Filamentosos. A atividade citotóxica foi determinada pelo teste de inibição do crescimento celular baseados no método do MTT. O extrato clorofórmico em 50µg/mL apresentou inibição de 80,6% e nas dosagens de 25,0, 12,5, e 2,25µg/mL apresentaram inibição 60,5, 42,0 e 33,5% para células HEP-2 (Carcinoma de Laringe). A análise nutricional avaliada pelos métodos de gravimetria, extração com Soxhlet, emissão de chamas e Kjeldahl revelou alto teor energético e baixo teor de gordura, resultando 10,31% de umidade e substâncias voláteis, 9,47% cinzas; 17,52% proteínas; 4,42% lipídeos; 58,28% carboidratos; 342,98 Kcal valor calórico total; 22,08% fósforo; 8,83% ferro; 42,65% fibra; 73,82% sódio e 45,87% potássio, superando o tubérculo. Através de cromatografia em coluna do extrato hexânico, foi isolado uma substância branca, (ponto de fusão 79-81°C). Na marcação com tecnécio-99m, usando sangue heparinizado de rato, mostrou que a *Dioscorea alata* não apresenta atividade antioxidante.

PALAVRAS – CHAVES: *DIOSCOREACEAE*, *Dioscorea alata*, inhame água.

ABSTRACT

Dioscorea genus is the most important of the Dioscoreaceae family, presenting about 600 species. This genus has five important species in the human and animal food: *Dioscorea cyenensis*, *Dioscorea. alata*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea esculenta* and *Dioscorea trifida*. *Dioscorea Alata* (yam water), which is original of the Southeast of Asia and cultivated in the tropic has medicinal properties. Besides being antifungal and pharmacological, it has the power to detoxify and clean the blood and intestine. Its leaves were extracted with solvents aiming to identify the active beginnings found to study the antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity. Different extracts were submitted to the screen of ten microorganisms and they presented activity in the hidroalcoholic and chloroformic extracts for bacteria Gram-positive, Gram-negative and Resistant Acid-alcohol, Yeasts and Filamentous fungus. The cytotoxic activity was determined by the test of inhibition of the growth based in the method of MTT. The chloroformic extract in 50µg/mL presented inhibition of 80,6% and in 25,0, 12,5, and 2,25µg/mL presented inhibition 60,5, 42,0 and 33,5% for cells Hep-2 (Carcinoma of Larynx). The nutritional analysis appraised for the gravimetric methods, extraction with Soxhlet apparatus, emission of fires and Kjeldahl revealed high energy tenor and low fat tenor, resulting 10,31% of humidity and volatile substances, 9,47% gray; 17,52% proteins; 4,42% lipids; 58,28% carbohydrates; 342,98 Kcal total caloric value; 22,08% phosphorous; 8,83% iron; 42,65% fiber; 73,82% sodium and 45,87% potassium, overcoming the tuber. Through chromatography in column of the hexanic extract, a white substance was isolated, (melting point 79-81°C). In the demarcation with technetium-99m, using heparin mouse blood, it showed that *Dioscorea alata* doesn't present antioxidant activity.

KEYS - WORDS: *DIOSCOREACEAE*, *Dioscorea alata*, yam water.



1 INTRODUÇÃO

Dioscorea alata

1 – INTRODUÇÃO

Desde os tempos primitivos, o homem busca nas plantas a fonte de seu bem estar, seja como alimento, vestuário ou medicamento. Nas plantas medicinais, ele encontrou a forma mais eficaz e econômica de curar as doenças. O processo de evolução da “arte da cura” se deu de forma empírica, em processo de descobertas por tentativas, de erros e acertos (MORS, 1982). Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, do reconhecimento do habitat e da época da colheita (LEVI-STRAUSS, 1989; SCENKEL, 1985).

Após a identificação das espécies, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes, triturar sementes e as técnicas de conservação que iriam iniciar a configuração de um corpo teórico-prático do conhecimento que constituíram a medicina do homem primitivo. Sua aplicação se renova a cada dia, mas os cientistas alertam sobre o perigo do uso inadequado. Supõe-se que mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento folclórico, e estas plantas são usadas popularmente contra dezenas de doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônicos degenerativos, emagrecimento, regulação da menstruação, procedimento abortivo e, até como antídoto ao veneno de cobra. Como qualquer medicamento, os fitoterápicos, que são medicamentos à base de plantas medicinais, devem ser consumidos com orientação médica (SIMÕES, 2001).

Por causa da extração predatória, da falta de orientação dos usuários e da comercialização de madeira, muitas espécies estão desaparecendo e o mercado sente a falta da matéria prima de qualidade. Por outro lado, resta muito a se descobrir. São várias as espécies desconhecidas ou que ainda não foram analisadas pelos cientistas.

Um dos fatores que influenciam na produtividade do princípio ativo é a variedade da planta. Uma mesma espécie, cultivada e coletada nas mesmas condições ambientais pode apresentar diferentes quantidades de princípios ativos.

As plantas continuam sendo importantes no descobrimento de novas drogas, como fornecedoras do princípio ativo ou medicamentos semi sintéticos ou sintéticos baseados em seus compostos secundários.

O valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia do Estado é incalculável, visto que a indústria farmacêutica tem nos princípios ativos extraídos das plantas, seu principal espelho para a modificação da estrutura molecular no desenvolvimento de novos medicamentos.

Este trabalho foi realizado, levando em conta o teor nutricional, com a intenção de incluí-lo na alimentação humana, uma vez que o tubérculo da *Dioscorea alata* além de ser rico em nutrientes, tem também propriedades medicinais.

Grande parte da população brasileira sofre por carências alimentares. As condições sócio-econômica dessa população cada ano se agrava por falta de alimentos, enquanto toneladas de frutas, verduras e legumes vão para o lixo. Milhares de frutos, sementes, raízes e folhas são desperdiçados na colheita, por ignorância e falta de conhecimento nutricional. Sabe-se que quando parte de uma planta é comestível, geralmente toda planta também é. Baseados nestes dados decidiu-se fazer o estudo da folha da *Dioscorea alata*, levando em conta o teor nutricional, comparando os dados do tubérculo empregado na alimentação, com as análises da folha, uma vez que esta é desperdiçada na colheita, sendo as vezes destinada a alimentação de animais e, em outros casos, incineradas.



2 OBJETIVOS

Dioscorea alata

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e biológico dos constituintes das folhas da *Dioscorea alata*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar os princípios ativos encontrados
- b) Estudar as atividades antimicrobiana e citotóxica.
- c) Determinar o valor nutricional
- d) Realizar o estudo Radiofarmacológico
- e) Pesquisar a existência de isoflavonas e/ou esteróides



3 REVISÃO DA LITERATURA

Dioscorea alata

3. REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Dioscorea* é o mais importante da família Dioscoreaceae, apresentando cerca de 600 espécies, embora talvez existam algumas que ainda sejam desconhecidas para a ciência. Embora seja elevado o número de espécies de *Dioscorea*, apenas cinco são consideradas importantes na alimentação humana: *Dioscorea cayenensis*, *Dioscorea alata*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea esculenta* e *Dioscorea trifida*. Destas, apenas a *Dioscorea trifida*, é brasileira, sendo as outras de origem africana e asiática (ABRAMO, 1990).

A *Dioscorea alata* (inhame água) é originada do sudeste da Ásia, amplamente cultivada nos trópicos, da qual encontram-se as cultivares Cará São Tomé, e Nambu, bastante cultivadas em Pernambuco, é um inhame comestível, onde apresenta tubérculos brancos. Algumas variedades apresentam pigmentos na polpa (SHOYAMA *et al*, 1990).

O inhame é a maior fonte de alimento no continente tropical. A maioria das espécies possuem a polpa do tubérculo de cor branca, mas algumas espécies tem a polpa colorida, nas Filipinas o pigmento da polpa é amplamente usado para colorir alimentos (RASOER, 1967). As antocianinas simples tem sido caracterizadas a partir de pigmentos, análise de HPLC revelou que os pigmentos da polpa consistem principalmente de três complexas antocianinas aciduladas através de um ou dois ácidos aromáticos (IMBERT, 1968).

A maior produção de inhame no Brasil, ocorre no Nordeste, especialmente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Piauí, onde são cultivadas basicamente a espécie *Dioscorea cayenensis* conhecida como “roxo da costa” e alguns clones da *Dioscorea alata* (cará São Tomé) (MONTALO, 1991).

O inhame pode ser cultivado em diversos tipos de solo, porém os mais recomendados são os de textura arenosa e média, suficientemente profundos, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matérias orgânicas, com pH entre 5,5 a 6,0, permitindo melhor desenvolvimento das túberas e maiores produção (ARAÚJO, 1982).

O inhame é um dos exemplos mais interessantes de alimentos com propriedades medicinais, como também é uma fonte natural e barata de energia, com maior valor nutritivo que o pão. É citado praticamente em todos os livros sagrados e nos clássicos compêndios médicos de todos os tempos (<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloint.html>).

Os antigos alquimistas sabiam dos poderes mágicos do inhame e utilizavam-no no preparo de diversas fórmulas medicinais. Entre as propriedades farmacológicas está o poder desintoxicante e depurativo, ou seja, é capaz de eliminar toxinas do sangue e do intestino. Por isso é recomendado no tratamento de muitas doenças, principalmente o reumatismo, artrite, ácido úrico, inflamações em geral, em todas as infecções, viroses e micoses. Há pouco tempo era utilizado o elixir do inhame no tratamento de sífilis, com bons resultados. Apresenta ainda propriedade importante de restaurar e de manter o sistema imunológico saudável e resistente (HIRSCH, 1995).

Na Índia, o sistema médico ayurvédico indica, há milênios, a ingestão em abundância de inhame cozido para refazer as defesas orgânicas, principalmente no combate a infecção e tumores. Entre os índios da América Central e do Sul, incluindo os índios brasileiros, persiste até hoje a tradição medicinal de se utilizar inhame como preventivo da malária, da febre amarela e todas as doenças endêmicas, infestações e parasitoses (NEUWINGER, 1994). Sonia Hirsch, em seu livro, chama atenção para uma substância encontrada no inhame com ação semelhante a da progesterona (JORNAL O DIA, 2000). As taxas desse hormônio baixam nos dias que precedem a menstruação, e o inhame ajuda a restabelecer o equilíbrio, diminuindo a tensão pré menstrual (TPM) e principalmente, a retenção de líquido, causadora do inchaço (REVISTA NOVA, 1998). Bontempo, (1964), em seu Guia Prático de Alimentação Natural, refere-se a Carlos Eugênio Ventura Lopes, médico orto molecular graduado pela American College Advanced in Medicine, nos Estados Unidos, como autor de um coquetel a base de inhame que repõe a deficiência mineral e vitamínica, eliminando sintomas, como dores de cabeça e dor nos seios, náuseas tensões, nervosismo e depressão. O tratamento é bem sucedido em 95% dos casos.

O inhame comestível é o alimento básico no Oeste da África, e sua produção no mundo chega a cerca de 20 milhões de toneladas. Os tubérculos de muitas cultivares mostram forte reação amarronzada quando são cortadas e expostas ao ar. Essa coloração amarronzada, tem sido atribuída a oxidação de compostos fenólicos sob a influência de um O-dihidroxi-fenoloxidase sobre O-dihidroxi- ou *vic*-trihidroxifenóis (PLUMBLEY, 1994).

A *Dioscorea alata* é produtora de túberas de alto valor nutritivo e energético para alimentação humana, é rica em carboidratos e pobre em gordura. É muito indicada na alimentação infantil pelo seu alto valor energético. Possui sais minerais: cálcio, fósforo e ferro, além de vitaminas do complexo B, principalmente B1 (Tiamina) e B5 (Niacina) (ZÁRATE *et al*, 2002).

O principal composto fenólico em *Dioscorea alata* foi relatado ser uma catecolamina juntamente com dois outros oxidáveis leucoantocianidinas.

A leucoantocianidina foi também identificada em *Dioscorea cayenensis* em adição a catecolamina idêntica a da *Dioscorea alata*.

Foi calculado o teor fenólico de dez cultivares de inhame a partir de cinco espécies, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dumentorum* e *D. rotundata*. Em geral, o nível de conteúdo fenólico para cada espécie foi similar, com exceção somente para a *Dioscorea cayenensis*, que mostrou um intermediário com baixo conteúdo fenólico, a *Dioscorea alata* e *Dioscorea bulbifera* tem alto conteúdo fenólico e *Dioscorea rotundata* o menor (OZO *et al*, 1984).

Vários açúcares solúveis (monossacarídeos, dissacarídeos e polióis) foram isolados a partir de folhas, talos, raízes e tubérculos de inhames (*Dioscorea*) foram analisados através de cromatografia a gás. Grandes quantidades de D-frutose, D-glucose e polióis (2-deoxiribitol, 6-deoxisorbitol, glicerol) foram encontrados nas folhas. Os talos, raízes e tubérculos contém várias quantidades de D-frutose, D-glucose, sucrose e maltose. O cromatograma de açúcares solúveis a partir da *D. alata*, *D. rotundata* e *D. dumentorum* são idênticas e indica que a sucrose é o principal açúcar livre. O tubérculo da *D. esculenta* contém grandes quantidades de D-frutose, D-glucose e maltose, em adição a sucrose. Todos esses compostos foram identificados através de espectrometria de massa (KOUASSI *et al*, 1990).

Foram investigados os efeitos do cozimento dos nutrientes e antinutrientes contidos nos tubérculos de *Dioscorea alata* e *Dioscorea esculenta*. A proteína contida no tubérculo cru, tem tendência a diminuir quando cozido. Também foi estudada a mudança composicional de três diferentes métodos de cozimento: cozido a fervura, cozido a vapor e cozido a forno para descobrir a conservação ótima do nutriente, fitato e oxalato contidos nos tubérculos de *Dioscorea alata* e *Dioscorea esculenta*.

Cozido a fervura: Foi adicionado água ao tubérculo cortado em pedaços numa proporção (1:1) e a mistura foi cozida em um recipiente fechado de aço inoxidável por 30 minutos. Após cozimento a água foi descartada.

Cozido a vapor: O tubérculo cortado em pedaços foi cozido a vapor por 15 minutos em panela com pressão.

Cozido a forno: O tubérculo em pedaços foi embalado em folhas de alumínio e cozido no forno com circulação de ar a 180°C por 45 minutos.

Após cozimento as amostras foram secas a temperatura ambiente, trituradas para garantir homogeneidade e estocada em saco plástico a 4°C para subsequentes análises. A proteína contida no tubérculo cru diminuiu em todos os métodos de tratamento. A gordura, a fibra e o açúcar total contidos no tubérculo cru foram afetados no cozimento. Nos três métodos de cozimento o teor de vitamina C contida no tubérculo diminuiu. O fitato contido não foi alterado, enquanto que o oxalato total contido no tubérculo foi significativamente reduzido no método de cozimento empregado. A perda de oxalato foi grande no cozimento a fervura (40-50%), comparado com o cozimento a vapor (20-25%) e a forno (12-15%). Após essa pesquisa foi observado significativa redução nas cinzas contidas nos tubérculos após cozimento a fervura e também grande retenção dos minerais no cozimento a fervura e a vapor.

O resultado geral indicou que os efeitos de cozimento a fervura, a vapor e a forno sobre os nutrientes contidos nos tubérculos foi similar nos três métodos (WANASUDERA, *et al*, 1992).

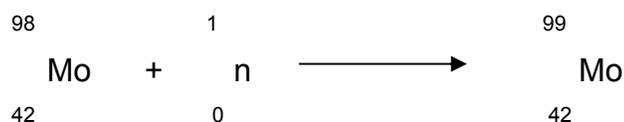
Embora não haja dados na literatura sobre o estudo radiofarmacológico em *Dioscorea alata*, mas levando em conta a frequente utilização do radioisótopo tecnécio-99m na medicina nuclear para procedimentos de vários diagnósticos incluindo a marcação de células sanguíneas como hemácias, leucócitos e plasma, foi realizado o estudo radiofarmacológico nas folhas da *Dioscorea alata*. Este estudo teve o objetivo de verificar o grau de coincidência com o agente redutor do tecnécio-99m, pois os pesquisadores do mundo inteiro buscam um produto de origem natural que tenha as mesmas características do cloreto estano.

A marcação de hemácias com ^{99m}Tc possui importante aplicação, porque é possível registrar imagens do sistema cardiovascular, detectar e localizar hemorragias gastrointestinais, medir o volume das células vermelhas e obter imagens do baço. A marcação de leucócitos com ^{99m}Tc tem sido empregada para localizar sítios de infecção, diagnóstico precoce de rejeição de tecidos transplantados e avaliação de casos de doenças inflamatórias não diagnosticadas. As proteínas plasmáticas marcadas pelo radionuclídeo, tem sido usadas na determinação do volume de sangue, avaliação da função cardíaca e perfusão pulmonar, estudo de perda de proteínas gastrointestinais e localização da placenta (GUTFILEN, 1996).

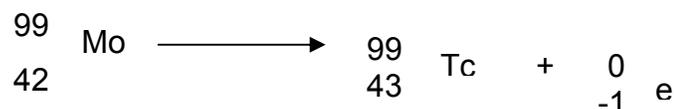
O tecnécio é um metal de transição que pertence ao grupo VII B da tabela periódica, de número atômico 43 e massa atômica 99,9062, possui sete elétrons na última camada, podendo perder esses elétrons e passar para um estado de oxidação +7, originando o íon pertecnetato (TcO_4^-). Esse radionuclídeo no estado de oxidação +7, é uma espécie não-reativa e desse modo não pode se fixar às estruturas químicas por adição direta, por isso é necessária a redução do tecnécio-99m do estado +7 para um estado de oxidação mais baixo de +4. Portanto, o cloreto estano é normalmente utilizado como agente redutor (BRAGA *et al.*, 2000).

A molécula de hemoglobina é o sítio de ligação do tecnécio-99m, e para haver fixação no interior das hemácias, os íons pertecnetato e estanoso atravessam a membrana plasmática das células, provavelmente por transporte ativo, através do sistema de transporte ânion Banda 3 (íon pertecnetato TcO_4^-) e Canais de Cálcio (íon estanoso, Sn^{2+}) (OLIVEIRA *et al*, 1997).

A fonte de tecnécio-99m é o molibidênio-99m, que é produzido pelo bombardeamento do molibidênio-98 por nêutrons no reator nuclear.



Muitos laboratórios de radiologia têm um pequeno gerador de radioisótopo contendo molibidênio-99, que decai para formar o tecnécio-99m.



3.1. Constituintes químicos de diferentes espécies de *Dioscorea*.

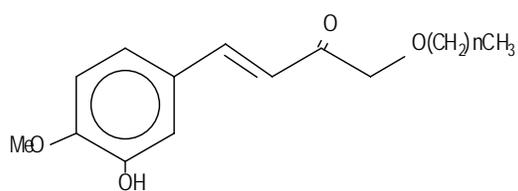
Dioscorea dregeana

A *Dioscorea dregeana* é uma planta originada do Sudeste da Ásia, é uma planta narcótica muito usada pela medicina popular Zulu (MANDER, 1998). A partir da *Dioscorea dregeana* foram isolados alcalóides, derivados esteroidais (sapogeninas, saponinas, fitosteróis) e fenantreno (MULHOLLAND *et al*, 2002).

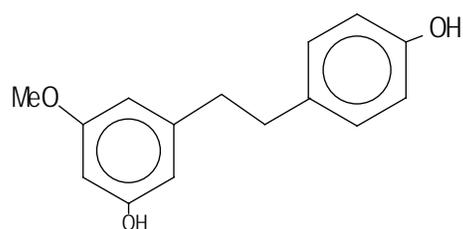
Neste estudo os tubérculos foram secos e moídos até formar um pó fino, e extraído com hexano, cloreto de metileno, acetato de etila e metanol. A extração com hexano produziu os fitosteróis – sitosterol e sigmasterol. O dodecanosil 3-(hidroxi, 3-metóxi fenil) propenoato, **(1)**, foi isolado a partir da extração com cloreto de metileno e 3, 4, 5-trihidroxidibenzil, **(2)**, foi isolado a partir do extrato com acetato de etila. O extrato metanólico foi dividido em duas partes. Metade foi

acidificada com ácido clorídrico (HCl) diluído e extraído com éter dietílico. Essa fração ácida foi em seguida adicionada uma base, e extraída com éter dietílico para produzir cinamina, **(3)** Dioscorina, **(4)** que foi isolada na segunda metade da fração metanol.

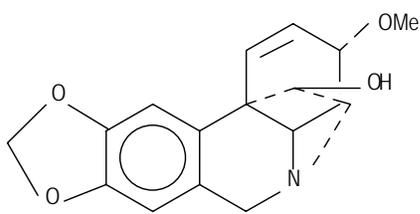
Os compostos foram identificados através de métodos espectroscópicos (LEET, 1977; ADESANIA *et al.*, 1989; MAJUNDER & PALL, 1993).



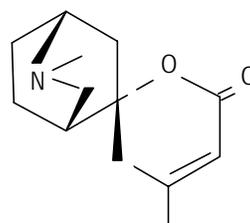
1



2



3



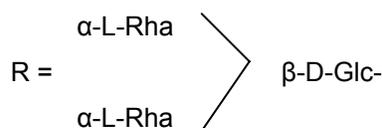
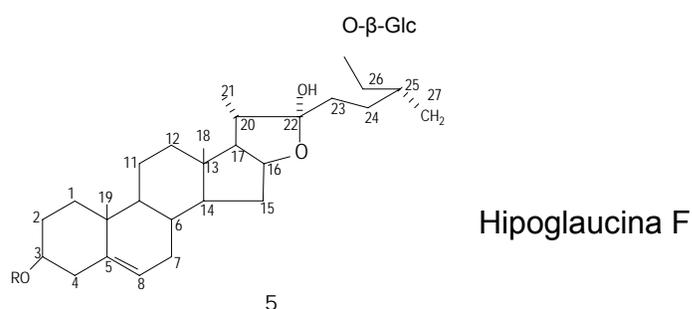
4

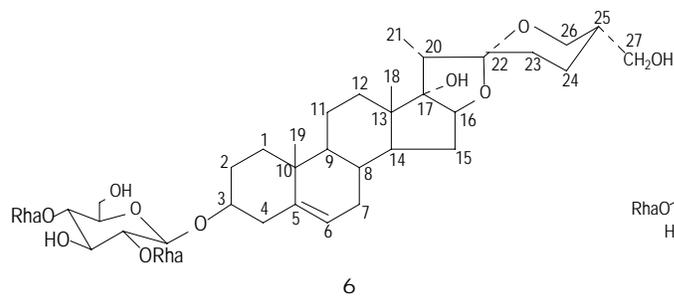
Dioscorea collettii

Os rizomas da *Dioscorea collettii* são muito usados na tradicional medicina chinesa para o tratamento de carcinoma cervical, carcinoma de bexiga e tumor renal. É distribuída principalmente no Sudeste da China. Um novo furostanol saponina, nomeada hipoglaucina F (**5**), foi isolada a partir de rizomas da *Dioscorea collettii*, juntamente com sete compostos conhecidos (HU, *et al*, 1997).

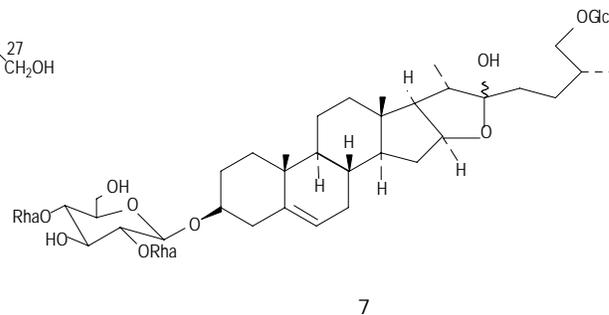
A fração saponina bruta da *Dioscorea collettii* foi fracionada através de uma combinação de cromatografia de sílica gel e HPLC sobre sílica gel RP-18 para produzir vários compostos. Os compostos foram identificados como a conhecida prosapogenina A de dioscina, gracilina, protoneodioscina, protoneogracilina, protogracilina, metil protoneodioscina, metil protodioscina, metil protoneogracilina, metil protogracilina e também dioscina (**6**) e protodioscina (**7**) respectivamente.

A Hipoglaucina F (**5**) foi obtido como um pó amorfo branco e mostrada uma coloração púrpura com o reagente de Ehrlich. Através de análises cromatográficas e dados dos espectros de ^{13}C NMR e ^1H , o composto **5** foi determinado como sendo, (2SS)-26-O- β -D-glucopiranosil 22-hidroxi-5-en-furostano-3 β , 26, 27-triol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosida (HU *et al*, 1997).





Dioscina



Protodioscina

Dioscorea rotundata

A *Dioscorea rotundata* é o principal tubérculo consumido no Oeste da África (EJECHI, *et al*, 1999) É um alimento de natureza perecível com abundância limitada no período de colheita (Junho-Agosto) e após esse período torna-se escasso e dispendioso. A *Dioscorea rotundata* é bastante perecível durante a colheita e armazenagem devido a fungos ou bactérias, isto por falta de barreiras antômicas tais como cascas, e também porque a periderme cortical é fina e dá margem a penetração de microrganismos. Por isto são submetidos a processos químicos e a radiação gama (OGUNDANA, 1972; ADESUYI, 1978). Para evitar os métodos anteriores de preservação, fazendeiros nigerianos usam extratos aquoso de folhas de uma planta ornamental a *Acalypha hispida* (Euphorbiaceae), que tem atividade tripanosomida (OKANLA *et al*, 1990) para inibir o crescimento de alguns fungos. Os extratos da *Acalypha hispida* mostraram atividade antifúngica. Esta atividade é devido a presença de ácidos fenólicos os quais são inibidores de doenças de plantas (STAFFORD, 1974; MATERN & KNEUSEL, 1988).

Esta pesquisa considerou os fungos *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. e *Aspergillus niger*. Todos os fungos testados foram susceptíveis para a ação inibitória dos extratos da folha de *Acalypha hispida*, entre os extratos testados o fenólico requereu menor concentração que o extrato aquoso para produzir inibição. Ambos os extratos também inibiram atividade amilase do *Aspergillus niger*, em um dos fungos testados. O fungo foi susceptível

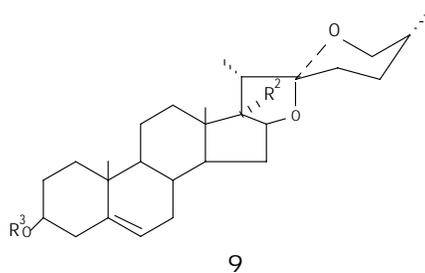
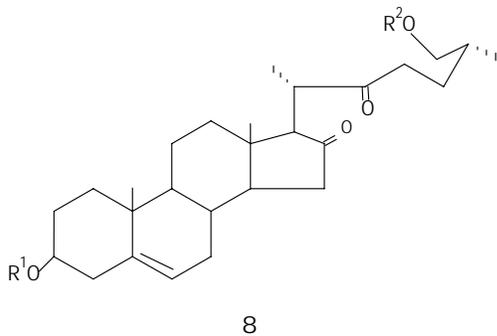
aos extratos com uma concentração mínima inibitória (CMI) de extensão 6,0-16,5 mg/ml. O extrato fenólico foi mais ativo que o extrato aquoso.

A biodeterioração dos tubérculos de inhame fresco inoculados por oito meses foi reduzido em 52-66% seguindo tratamento com os extratos, enquanto que os tubérculos não inoculados adquiridos em supermercados, a deterioração foi reduzida em 16% (EJECHI, *et al.*, 1999).

Dioscorea olfersiana

Dioscorea olfersiana conhecida popularmente no Brasil como cará, é um tubérculo comestível. O extrato polar de cará mostrou uma complexa mistura de saponinas em cromatografia de camada fina em sílica gel (TLC) com 12 distintas manchas. A hidrólise ácida de seus produtos depois de várias recromatografias, mostrou dois produtos (**8** e **9**), além da diosgenina (**10**). Os produtos (**8**) e (**9**) foram identificados como uma mistura de kriptogenina 3-O-β-D-glucopiranosida (**8a**) e kriptogenina 26-O-β-D-glucopiranosida (**8b**), a diogenina 3-O-β-D-glucopiranosida (**9a**) e penogenina 3-O-β-D-glucopiranosida (**9b**) respectivamente. O espectro ¹³CNMR mostrou que parte da aglicona exceto para o C-3 e C-26 (**8**) assemelha-se a kriptogenina.

Foram usadas espectroscopia ¹³CNMR como uma ferramenta para identificar as misturas esteroidais glucosidas. As saponinas foram purificadas através de cromatografia de sílica gel para produzir os compostos (**8**), (**9**) e (**11**) (HARAGUCHI *et al*, 1994).

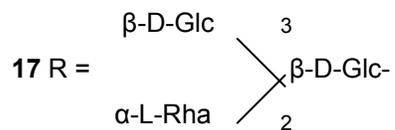
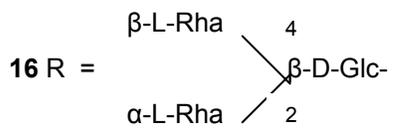
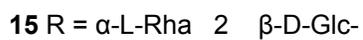
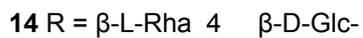
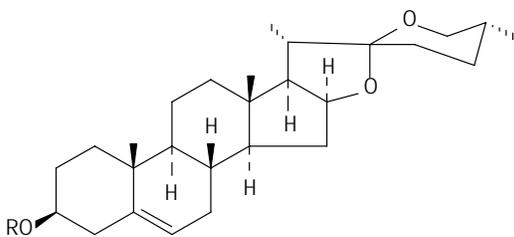
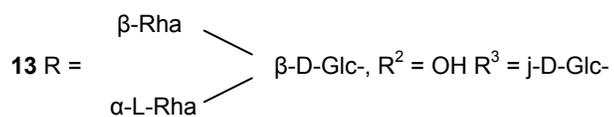
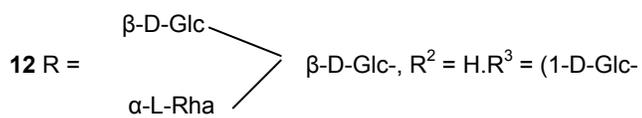
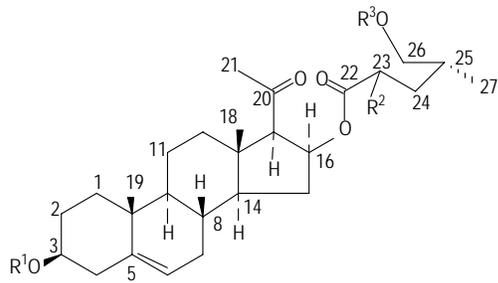


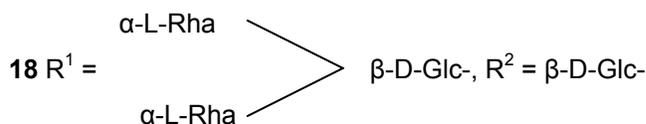
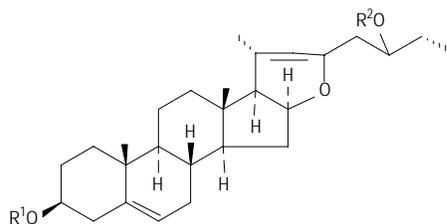
	R ₁	R ₂
8a	Glc	H
8b	H	Glc
11	H	H

	R ₁	R ₂
9a	Glc	H
9b	Glc	OH
10	H	H
8	H	OH
9	Glc ⁴ - ¹ Ara	OH
	Paracetato	

Dioscorea panthaica

A *Dioscorea panthaica* é uma planta medicinal muito distribuída em algumas das províncias da China, conhecida como uma rica saponina herbária usada no tratamento de gastropatia, contra o bacilo antrax e reumatismo. A partir de produtos biologicamente ativos da *Dioscorea panthaica*, foram isolados dois novos furostanol saponinas, as Dioscorecidas A (**12**) e B (**13**), junto com cinco novas saponinas, progenina II (**14**), progenina III (**15**), dioscina (**16**), gracillina (**17**) e pseudo-protodioscina (**18**) foram isoladas a partir de rizomas da *Dioscorea panthaica*. A partir do extrato etanólico dos rizomas da *D. panthaica* foram produzidas dois novos furostanol saponinas (**13**) e (**14**), que se mostraram como um sólido amorfo branco (DONG *et al*, 2001).



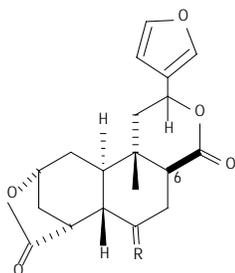


Dioscorea bulbifera

A *Dioscorea bulbifera* é encontrada no norte do distrito de Bangladesh, onde o tubérculo amargo é usado pelos tribais para o tratamento de leprose e tumores.

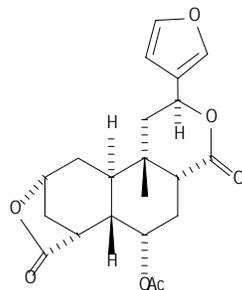
A partir da *D. bulbifera* extraída com benzeno, foi isolado o Diosbulbin D (**19**) e um novo furanóide, norditerpenóide com estrutura do acetato 8-epidiosbulbin E (**21**). A configuração para o C-8 no acetato, foi oposta ao ocorrido em acetona (**19**) e o álcool correspondente Diosbulbin E (**20**).

Os dois compostos foram separados através de cromatografia preparativa (TLC), eluidos com etanol para dar o Diosbulbin D (**19**), e acetato 8-epidiosbulbin E (**21**). A análise de NMR¹H, levando em conta o deslocamento do spin e a rotação óptica estabeleceu a conformação (**22**) para o norditerpenóide (**19**). Para o Diosbulbin D foi determinada a configuração (**23**) correspondente com a estrutura (**21**) (MURRAY *et al*, 1984).

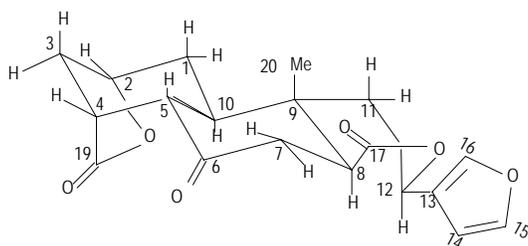


19. R = O

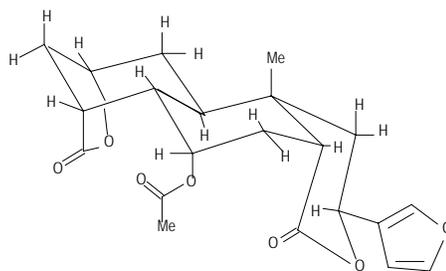
20. R = α -OH, 6-H



21



22



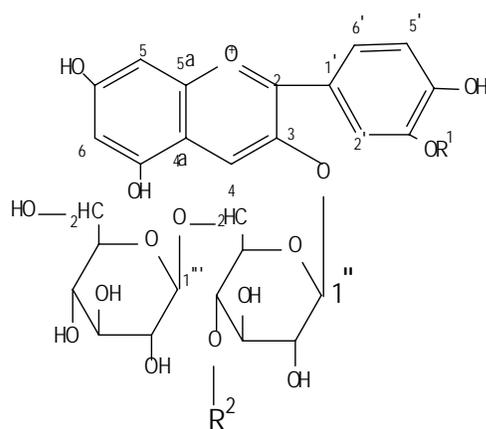
23

Dioscorea alata

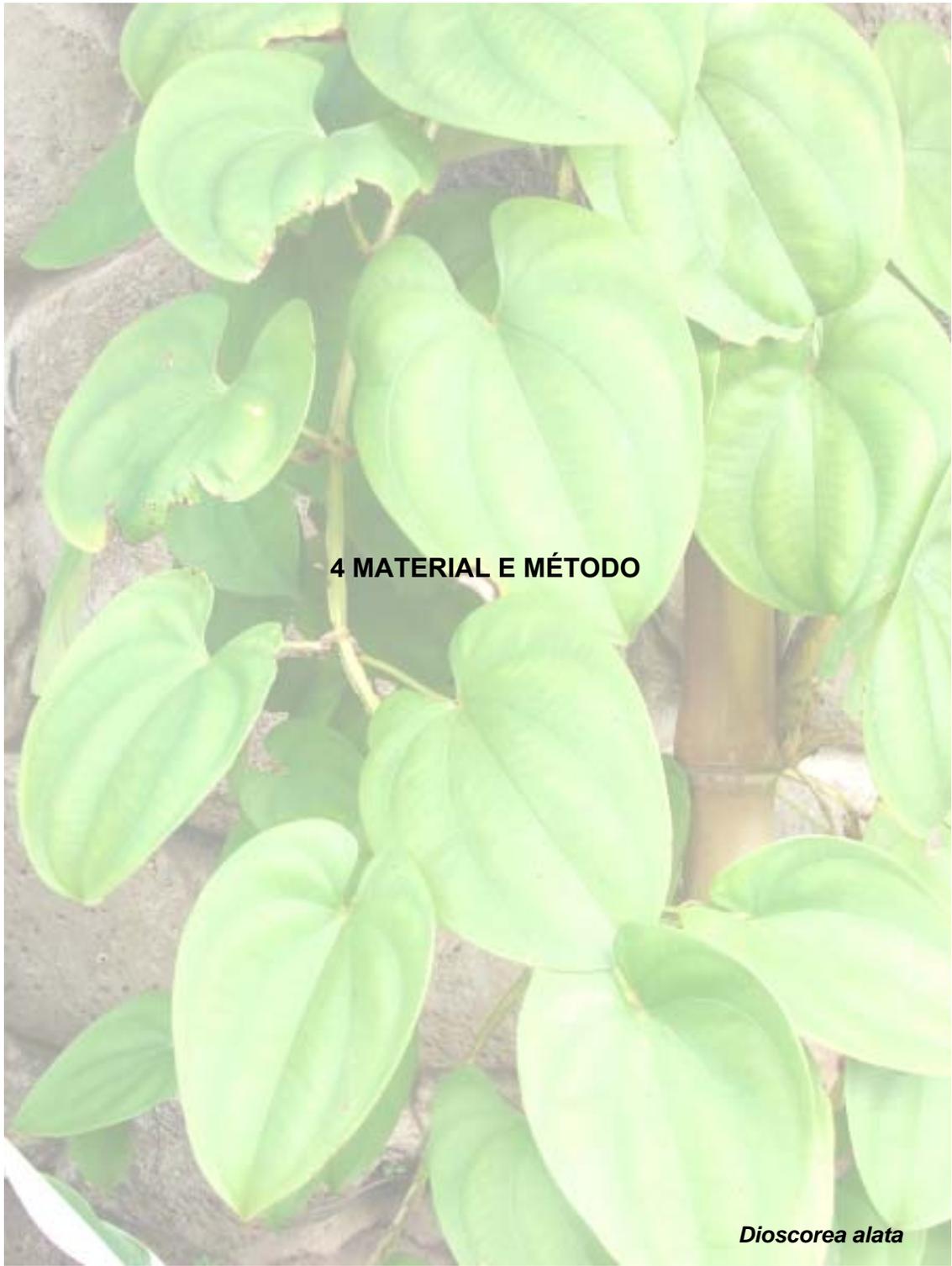
Da *Dioscorea alata*, foi isolada três alataninas A (**24**), B (**25**) e C (**26**) (YOSHIDA *et al*, 1991). Os tubérculos da *Dioscorea alata* foram congelados com nitrogênio líquido, ralado e extraído com 1% de ácido trifluoroacético (TFA). O extrato foi concentrado, filtrado e cromatografado em coluna preparativa (ODS), usando uma escala de solução de 3% H₃PO₄ aquoso, para 6% CH₃COOH e 7,5% CH₃CN aquoso. Além desta purificação também foi usada a cromatografia líquida (HPLC) usando 14% de CH₃CN aquoso contendo 0,5% de TFA como eluente

O composto (**27**) foi obtido como pó vermelho púrpuro. O espectro UV-visível de (**24**) mostra que a OH-3 da aglicona é glicosilada e um grupo cinâmico do ácido acil está presente. O espectro de massa indicou que (**27**) é composto de cianidina. A hidrólise de (**27**) com 2M de HCl a 95°C dá cianidina, glucose e ácido sinápico. O espectro de ^{13}C NMR de (**27**) mostrou que C-6 de parte da glucose é mudada através de glicosilação; portanto é uma 3-gentiobiosida, onde foi confirmado através de hidrólise parcial de (**27**) com 0,6M de HCl produzindo (**28**), que foi identificado como cianidina 3-O-gentiobiosida através de TLC, FAB espectro de massa e UV-visível (HARBONE, 1958).

Também foi isolado um composto vermelho púrpura **29**, que após reação de hidrólise, os métodos espectroscópicos mostraram ser idêntico a **27**, exceto a aglicona que foi peonidina (SHOYAMA, *et al.*, 1990).



- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 27. R' = H | R ² = Sinapoyl |
| 28. R' = H | R ² = H |
| 29. R = Me | R ² = Sinapoyl |



4 MATERIAL E MÉTODO

Dioscorea alata

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA.

4.1.1. Obtenção dos Extratos

A partir das folhas secas e trituradas foram preparados três extratos diferentes, um com uma mistura de etanol e água (80:20), o extrato hexânico e o clorofórmico, extraídas três vezes consecutivas com agitação mecânica. Estas frações foram evaporadas, pesadas e submetidas a testes microbiológicos, para localização do princípio ativo.

4.1.2. Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada qualitativamente, pelo método convencional de difusão em disco de papel, e quantitativamente, pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI). O estudo foi realizado frente à 10 microrganismos resistentes, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido, leveduras e fungos filamentosos.

4.1.3. Microorganismos-Teste

Foram utilizados representantes dos diversos grupos de microrganismos, pertencentes à Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos (DAUFPE) e isolados clínicos (IC), fornecidos pelo laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPE:

Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (DA UFPE-01)
Staphylococcus aureus (IC-648)
Staphylococcus aureus (IC-649)
Micrococcus luteus (DA UFPE-06)
Bacillus subtilis (DA UFPE-16)
Enterococcus faecalis (DA UFPE-138)

Bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (DA UFPE-39)
Pseudomonas aeruginosa (IC-653)
Escherichia coli (DA UFPE-224)
Serratia marcescens (DA UFPE-398)
Klebsiella pneumoniae (IC-700)
Acinetobacter sp. (IC-704)
Acinetobacter sp. (IC-706)
Acinetobacter sp. (IC-711)

Bactéria álcool-ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* (DA UFPE-71)

Leveduras: *Candida albicans* (DA UFPE-1007)
Candida krusei (DA UFPE-1002)
Candida parakrusei (DA UFPE-1005)
Candida pseudotropicalis (DA UFPE-1006)
Candida lipolytica (DA UFPE-1055)

Fungo filamentoso: *Monilia sitophila* (DA UFPE-2083)

As condições de cultivo e crescimento dos microrganismos-teste estão apresentadas na Tabela-1.

Tabela 1 – Condições de crescimento dos microrganismos-teste utilizados

Microrganismo	Meio de cultura	Temperatura (°C)	Tempo (h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Müeller - Hinton	35	24
<i>Micrococcus luteus</i>	Müeller – Hinton	35	24
<i>Bacillus subtilis</i>	Müeller – Hinton	35	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Müeller – Hinton	35	24
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	GL	35	48
<i>Enterococcus faecalis</i>	GL	35	24
<i>Escherichia coli</i>	Müeller – Hinton	35	24
<i>Serratia marcescens</i>	Müeller - Hinton	27	24
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud - ágar	30	48
<i>Monilia sitophila</i>	Sabouraud – agar	30	48

4.1.4. Meios de Cultura

4.1.4.1. Meios para realização dos testes de atividade:

Bactérias: Müller-Hinton-ágar
 Glicose extrato de levedura agar (GL)

Leveduras / fungos filamentosos: Sabouraud-ágar

4.1.4.2. Meios para manutenção dos microrganismos:

Bactérias: Ágar Nutritivo (AN)
 Glicose extrato de levedura agar (GL)

Leveduras / fungos filamentosos: Sabouraud-ágar

4.1.5. Padronização dos inóculos

Os inóculos bacterianos, foram obtidos a partir de culturas com aproximadamente 18 horas de incubação à 35°C em caldo Müller-Hinton.

Leveduras e fungos permaneceram durante 24-48 horas a 30°C em Sabouraud agar. As suspensões dos inóculos foram padronizadas a uma densidade óptica de 0,2 de absorbância a 600 nm, equivalentes à turvação 0,5 da escala de Mc Farland.

4.1.6. Semeio

Na superfície do meio de cultura foram colocados 0,1 mL da suspensão do microrganismo-teste, previamente padronizada, e feito o semeio com auxílio de alça de Drigalsky.

4.1.7. Teste de difusão em disco

Discos de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20µL da solução do extrato, ficando cada disco com uma concentração de 2000 µg/ml do extrato, e colocados sobre a superfície do meio previamente semeado com os microrganismos-teste, em placa de Petri. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas (bactérias) e 30°C durante 24-48 horas (leveduras e fungos filamentosos). Os testes foram realizados em duplicata e os resultados, expressos em mm, foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas duas repetições (BAUER *et al*, 1966). O teste controle do solvente foi realizado com discos embebidos em DMSO.

Foram realizados testes de comparação da atividade com antibacterianos e antifúngicos rotineiramente utilizados na clínica médica. Como padrão foram utilizados Cetoconazol (Neo-Química), para fungos e leveduras, e Cefalexina (Eurofarma) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, nas mesmas concentrações das substâncias testadas (CHIAPPETA, *et al* 1982-1983).

4.1.8. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os extratos que apresentaram halos iguais ou superiores a 14 mm de diâmetro foram selecionados para determinação da CMI.

Do extrato a ser testado, foram preparadas soluções a 5000 µg/mL, em DMSO. Alíquotas de volumes variados (1,0 – 0,9 – 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 – 0,1 mL) desta solução, foram colocadas em placas de Petri e incorporadas a 10 mL do

meio de cultura, por homogeneização, obtendo-se assim, diferentes concentrações da substância em cada placa (Tabela 2).

As placas contendo o extrato, bem como a placa testemunho (contendo apenas o meio de cultura) foram semeadas com as suspensões padronizadas do microrganismo-teste, em estrias, e incubadas durante 24 ou 48 horas a 37°C.

Os resultados foram obtidos considerando a menor concentração onde não ocorreu crescimento visível.

Os testes foram realizados em duas repetições e os resultados comparados com aqueles obtidos com antibióticos antibacteriano (Cefalexina, Eurofarma) e antifúngico (Cetoconazol, Neo-Química), testados nas mesmas concentrações.

As alíquotas e concentrações estão expressas na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração dos extratos nas diferentes alíquotas testadas na determinação da CMI (solução mãe 5000 µg/mL).

Alíquotas (mL)	Concentração µg/ mL
1,0	5.000
0,9	4.500
0,8	4.000
0,6	3.000
0,4	2.000
0,2	1.000
0,1	500

4.2. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

4.2.1. Determinação de umidade e substâncias voláteis (Lutz, 1985)

Em cápsulas de porcelana foram pesadas em duplicata cerca de 5g das folhas secas e moídas, esse material foi levado para estufa a 105°C durante quatro horas. Após esse período a amostra foi retirada, levada para o dessecador, esfriada até temperatura ambiente e pesada.

4.2.2. Determinação das cinzas (AOAC, 2002)

O material usado no teste anterior foi reaproveitado e submetido a uma pré-calcinação para que todo o restante das substâncias voláteis fossem eliminadas. Em seguida foi levada para a mufla a 550°C durante quatro horas. Após esse período, a amostra foi esfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada.

4.2.3. Determinação de proteínas (AOAC, 2002)

Em um vidro de relógio foi pesada cerca de 1g da folha seca e moída, sempre em duplicata, transferida para um balão de Kjeldahl e adicionado 10 ml de ácido sulfúrico. A seguir foi adicionado uma mistura catalítica de Dióxido de Titânio, Sulfato de Cobre e Sulfato de Potássio (0.3 : 0.3 : 6.0), com a finalidade de acelerar a reação. A mistura foi levada à capela e aquecida em chapa elétrica apropriada, até a solução se tornar clara à temperatura de 400°C. Após esfriamento foi adicionado cuidadosamente 200 ml de água destilada, 10 gotas do indicador fenolfitaléina e uma grama de zinco em pó. A mistura foi destilada e a presença de nitrogênio foi evidenciada pela mudança de coloração. Em seguida foi realizada a titulação com NaOH 0,1 N onde foi possível quantificar o nitrogênio.

4.2.4. Determinação de lipídeos (Extrato etéreo) (AOAC, 2002)

Em um cartucho de papel foram pesadas cerca de 3,0 g da folha seca e moída. O cartucho contendo a amostra foi colocado em uma coluna e adicionado éter para extração. Esse processo de extração durou cerca de 8 horas devido a grande quantidade de pigmentos na amostra. Terminada a extração, o conteúdo foi evaporado e levado para estufa e depois pesado.

4.2.5. Determinação de carboidratos (ASCAR, 1985)

A obtenção de carboidratos foi realizada através da diferença de 100 do somatório do teor de umidade e substâncias voláteis, cinzas, proteínas e lipídeos.

4.2.6. Determinação do valor calórico total (V.C.T.) (Manual nº 74 (195) do Dep. de Agricultura dos E.U.).

A determinação do valor calórico total (V.C.T.) é feita através de cálculos

$$VI = \text{V.C.T. (Kcal / 100g)}$$

$$\text{V.C.T.} = (\text{III} \times 4) + (\text{IV} \times 9) + (\text{V} \times 4)$$

$$\text{V.C.T.} = (17,52 \times 4) + (4,42 \times 9) + (58,28 \times 4) = 342,98 \text{ Kcal /100g}$$

Tabela – 3 Representação da nomenclatura para determinação do valor clórico total.

REPRESENTAÇÃO
III = Proteínas
IV = Extrato etéreo
V = Carboidratos
VI = V.C.T

4.2.7. Determinação de Fósforo (AOAC, 2002)

Em uma mufla foi incinerado durante 4 horas, 5g de amostra. Após incineração, a cinza foi dissolvida em 2 mL de água destilada, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de ácido nítrico concentrado. A amostra foi transferida para um béquer de 200 mL, e adicionado 40 mL de água destilada e aquecido até início de ebulição.

Após esfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado lentamente, no centro do béquer 50 mL da solução de molibdato de amônio e foi deixado em repouso por 4 minutos, onde precipitou. A mistura foi agitada por 30 segundos com bastão de vidro e foi deixada em repouso por 12 horas. A seguir o precipitado foi filtrado quantitativamente e lavado 3 vezes com nitrato de amônio 2%, de 5 em 5 mL e ainda foi adicionado 2 mL de etanol comum (o pH do álcool e do filtrado, foram medidos para constatar a não alcalinidade) e lavado com 1 mL de éter P.A.. Após esse procedimento o material foi levado para estufa a 95°C por 1 hora. O produto foi esfriado em dessecador por 20 minutos e pesado até peso constante.

4.2.8. Determinação de Ferro (AOAC, 2002)

Foi incinerado a 660°C, 5 gramas da amostra que foi analisada em duplicata onde obteve uma cinza clara e bem queimada. A cápsula foi lavada com 20 mL de HCl 1N, transferida para um balão de 50 mL e completado o volume com HCl 1N. Em outro balão de 50 mL foi adicionado 2 mL da solução e acrescentado 20 mL de HCl 1N, 2 mL da solução de hidroquinona, 2 mL de sulfito de sódio a 20% e 1 mL de fenontralina a 0,5% em álcool.

Foi preparado um branco, onde foram adicionados todos os reagentes menos a quantidade de amostra. O material foi agitado, deixado em repouso por 15 minutos, adicionado 10 mL de acetato de amônio a 20% e controlado o pH entre 4-5 . O volume foi completado para 50 mL com água destilada e lido no espectrofotômetro a 510 nm.

4.2.9. Determinação de Fibra Alimentar Enzimática (AOAC, 2002)

Em um béquer foi pesado com precisão, 0,2g da amostra em quadruplicata, e adicionado 50 mL de tampão fosfato. O pH foi ajustado para 7,5 mais ou menos 0,2 com NaOH 0,275N adicionando 10 mL para cada béquer e corrigido se necessário com NaOH ou HCl.

Imediatamente antes do uso, foi preparada uma solução de 50mg / mL de protease em tampão fosfato e usado 0,1 ml desta em cada béquer. Os béqueres foram cobertos com folhas de alumínio e aquecido em banho-Maria a 60°C com agitação continua por 30 minutos. Quando a temperatura interna do béquer atingiu 60°C foi incubado por 30 minutos, e deixado esfriar à temperatura ambiente. Depois de frio o pH foi ajustado para 4,0-4,6 pela adição de 10 mL de HCl em cada béquer, e ajustado com HCl ou NaOH quando necessário. Foi adicionado 0,1 mL de amiloglucosidade em cada béquer, que foi coberto com folha de alumínio e levado ao banho-maria a 60°C com agitação continua por 30 minutos. Foi medido 280 mL de etanol a 95% e aquecido a 60°C, e adicionado quatro volumes de

70 mL em cada béquer e deixado por uma noite em repouso à temperatura ambiente, para completa precipitação.

Previamente foram pesados vários cadinhos tipo funil, colocado celite, (como auxiliar de filtração) umedecido com 10 mL de etanol a 78%, e puxado à vácuo para compactar.

Foi mantida a sucção moderada e transferida a suspensão do precipitado de cada béquer para seu respectivo cadinho. O resíduo foi lavado com 3 porções de 20 mL de etanol a 78%, duas porções de 10 mL de etanol a 95%, e duas porções de 10 mL de acetona. Os cadinhos foram levados à estufa a 105°C por uma noite, e deixados no dessecador para esfriar à temperatura ambiente e pesados, (P2 = resíduo + celite + cadinho).

O resíduo de duas amostras e dois brancos para proteína, foram analisados pelo método da AOAC de Kjeldahl, e multiplicado o resultado de nitrogênio amoniacal por 6,25, convertido assim em proteína.

Também foram determinadas as cinzas do resíduo de dois cadinhos e dois brancos por 5 horas a 525°C. O material foi esfriado em dessecador e pesado, (P3 = cinzas + celite + cadinho).

4.2.10. Determinação de sódio e potássio (AOAC,2002)

Em um balão volumétrico a amostra foi dissolvida em água e o volume completado para 100 mL. A solução foi lida diretamente no espectômetro de chama com máxima transmitância de 768nm para sódio e potássio.

4.3. ESTUDO RADIOFARMACOLÓGICO

4.3.1 ANÁLISE DE MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99M e ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

Foram preparados dois extratos da folha de *Dioscorea alata*, um com clorofórmio e outro com água e etanol (extrato hidroalcoólico). Foram pesados cerca de 0,05g de cada extrato após secagem, para serem realizadas as análises de marcação com tecnécio 99m. Foram realizados dois experimentos, um com o extrato clorofórmio e outro com o hidroalcoólico.

O extrato hidroalcoólico foi dissolvido com 1 mL de solução salina e preparados cinco tubos para as concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100% a partir da solução do extrato com solução salina. Para controle foi usado um tubo contendo sangue heparinizado que foi incubado com solução salina. Foi adicionado em cada tubo 0,5 mL de sangue heparinizado, incubado durante uma hora e homogenizando por regulares intervalos de tempo. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada tubo 0,5 mL de cloreto estanoso na concentração desejada e incubado por mais uma hora. A seguir foi adicionado a todos os tubos 0,1 mL de Tc-99m, incubados durante 10 minutos, e centrifugado a 1500 rpm. O material centrifugado foi separado em duas partes: as células do sangue e do plasma. Foi adicionado 1 mL do ácido tricloroacético a 5% e separadas as frações solúveis e insolúveis do sangue e do plasma.

A radioatividade das amostras foram identificadas em duas partes: plasma e hemácia, sendo frações solúveis e insolúveis do plasma e frações solúveis e insolúveis da hemácia.

Desta forma, a percentagem da radioatividade foi calculada, e os valores obtidos foram multiplicados por 100.

As amostras foram realizadas em duplicatas e algumas em triplicatas e foi tirada a média aritmética. O mesmo procedimento foi aplicado com o extrato clorofórmico.

4.4. ESTUDO CITOTÓXICO

4.4.1. Determinação da Atividade Citotóxica

As culturas de células tumorais desempenham um importante papel no sistema de seleção de produtos com atividade antitumoral permitindo a indicação de substâncias com atividade antiproliferativa.

Os testes de atividade citotóxica foram realizados com células de linhagem Hep-2 (Carcinoma Epidermóide de Laringe) e NCIH-292 (Carcinoma Muco Epidermóide de Pulmão) em fase exponencial de crescimento, com 24 horas de repicadas. As células isoladas em MEM – Meio Essencial Mínimo (EAGLE, 1959), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de uma solução de antibióticos (penicilina 1000UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de glutamina 2000 μ M (NASCIMENTO *et al*, 1993).

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do Azul de Tripano, corante vital capaz de penetrar facilmente nas células eventualmente danificadas pelas manipulações experimentais, corando-as em azul; as células íntregas, vivas, permanecendo incolores (WEISENTHAL *et al*, 1983).

A atividade citotóxica dos extratos hidroalcoólico e clorofórmico foram avaliados pela média “in vitro” através de teste de inibição do crescimento celular baseados no método do MTT ou brometo [3-{4,5 dimetiltiazol-2-il}. Este método se baseia na capacidade apresentada por células de reduzir um sal tetrazólio de cor amarela em cristais azuis (Formazan), que precipita pela ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas para células vivas. Uma solução de MTT a 5 mg/mL foi preparada em PBS – (Phosphate Buffered Saline), estéril, em agitador magnético, durante 4 horas, em ausência de luz e em seguida filtrada em filtro Milipore® com poros de 0,22 μ m de diâmetro; esta solução foi conservada em refrigerador a 4% (MOSMANN, 1983, modificado por ALLEY *et al.*, 1988).

Foi utilizada uma suspensão de 5×10^4 células/ml; a suspensão foi distribuída em placa com 96 poços (225 μ l em cada poço), aos quais foi acrescentado 0,15 mL da substância teste, nas concentrações de 50, 10, 5 e

1,0_ug/mL. Após 72 horas de incubação a 37 °C em atmosfera úmida, foram adicionados 5,0_ul de MTT em cada poço. As placas reincubadas nas mesmas condições, por um período de 2 horas, após o qual o meio de cultura foi removido e adicionados 100_ul de DMSO em cada poço, para solubilização dos cristais (Formazan). A leitura foi realizada em leitor automático para placas Multiskan ELX-800, a 540nm.

4.5. ESTUDO FITOQUÍMICO

4.5.1 Coleta do material botânico

As folhas de *Dioscorea alata* foram coletadas na zona rural da cidade de Condado (PE). A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a Dr^a Alda de Andrade Chiappeta, do Departamento de Antibióticos da UFPE, com base em descrições existentes na literatura e comparação com material herborizado. Após a coleta, o material botânico (folha) foi secado à temperatura ambiente, triturado em moinho e estocado para realização do estudo.

4.5.2 Estudo fitoquímico (Prospecção de constituintes químicos)

O primeiro passo químico desse estudo foi efetuado através da abordagem fitoquímica com a finalidade de determinar as classes de compostos existentes no material, de acordo com a metodologia de Matos, (1997).

Foram preparados dois extratos, um com etanol/água (80:20) e outro com clorofórmio, cada um com 100g de folhas. Após filtração, o líquido foi submetido a diversos testes químicos para verificação de determinados componentes.

4.5.2.1. Testes para heterosídeos cianogênicos

Em um erlenmeyer de 250 ml com tampa foram colocadas 10g de folhas secas e moídas que foram suspensas em 50 ml de água, onde foi adicionado 1 ml de H₂SO₄ 1N. Uma fita de papel de picrato de sódio foi fixada à tampa sem deixar tocar no líquido. A mistura foi mantida em aquecimento a 50-60°C durante duas horas, e observado alteração na coloração do papel.

O aparecimento da cor vermelho-castanha no papel, indica a presença de heterosídeos cianogênico.

4.5.2.2 Prospecção dos constituintes do extrato hidroalcoólico

Cerca de 100g de folhas secas e moídas, foram extraídas com agitação mecânica três vezes consecutivas com uma solução de etanol e água na proporção de 80:20. Após cada extração o material foi evaporado e reextraído até completar a triplicata. Parte desse material foi distribuído para os testes de abordagem fitoquímica, seguindo a metodologia de Matos, (1997).

4.5.2.3 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Em três tubos de ensaio foram colocados cerca de 3 ml do extrato hidroalcoólico. O primeiro foi levado a pH 3 com HCl, o segundo a pH 8,5 com NaOH e o terceiro a pH 11 também com NaOH. Em cada tubo pode ser observado uma possível mudança de coloração. Os resultados foram obtidos de acordo com a tabela 4.

Tabela – 4. Observação de cores para os testes de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Constituintes	Cor e meio		
	Ácido pH 3.0	Alcalino pH 8.5	Alcalino pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavona, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho. Púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho. laranja

4.5.2.4 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Em dois tubos de ensaio foram adicionados cerca de 3 ml do extrato hidroalcoólico. O primeiro foi acidulado com HCl até pH 1-3 e o outro foi alcalinizado com NaOH até pH 11. Os tubos foram aquecidos com o auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos, cuidadosamente. O aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de constituintes especificados na tabela 5.

Tabela-5 Observação de cores para os testes de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

Constituintes	Cor e meio	
	Ácido pH 1-3	Alcalino pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequina (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavonona	-	Vermelho. laranja

4.5.2.5 Testes para confirmação de catequinas

A madeira de um palito foi umedecida no extrato hidroalcoólico, e o solvente evaporado. Um lado do palito foi tratado com HCl concentrado, usando um bastão de vidro. O palito foi aquecido por 2-3 minutos ao calor de uma chama de álcool,

evitando que ficasse tostado. A presença de coloração vermelha ou pardo avermelhada no lado acidulado do palito, confirma a presença de catequinas.

4.5.2.6 Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Em dois tubos de ensaio foram adicionados cerca de 3 ml do extrato hidroalcoólico. No primeiro foram adicionados alguns centigramas de magnésio em fita e 0,5 ml de HCl concentrado, o segundo foi usado como “branco”. O término da reação é indicada pelo fim da efervescência. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas.

4.5.2.7 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)

Em um béquer foram colocados cerca de 10 ml do extrato hidroalcoólico e evaporados à temperatura ambiente. O resíduo seco foi extraído três vezes com 1-2 ml de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um pequeno funil fechado com algodão, coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. Ao filtrado foi adicionado 1 ml de anidrido acético, agitado suavemente, e cuidadosamente acrescentadas três gotas de H_2SO_4 concentrado. A solução foi agitada suavemente e observada se houve rápido desenvolvimento de cores. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres.

4.5.2.8 Testes para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no teste anterior, foi dissolvido com 10 ml de água destilada, e a solução filtrada para um tubo de ensaio. O tubo foi arrolhado, e agitado fortemente por dois minutos. A formação de espuma abundante e persistente indica a presença de saponina.

4.5.2.9 Teste confirmatório para saponinas

Foram adicionados ao tubo preparado no teste anterior 2 mL de HCl conc. e deixado durante pelo menos uma hora imerso em banho-maria, depois de esfriado para temperatura ambiente, a solução foi neutralizada com NaOH a 3N, e novamente agitada. A presença de um precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponinas.

4.5.3 Teste para alcalóides

Cerca de 250 ml do extrato hidroalcoólico foram secos a pressão reduzida. O resíduo foi extraído duas vezes com 50 ml e 30 ml de HCl 1N, a solução foi filtrada em algodão para um funil de separação e foi adicionado NH_4OH conc. até pH 11. A solução resultante, contendo as bases orgânicas foi extraída três vezes com três porções sucessivas de clorofórmio 30, 20 e 10 ml de uma mistura éter : clorofórmio 3:1, a fase aquosa foi reservada para outro teste. As soluções contendo as bases orgânicas foram reunidas e tratadas com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o filtrado foi separado em duas porções. Uma destas foi evaporada a pressão reduzida para análise em cromatoplaça. A segunda foi novamente extraída três vezes com 10 ml de HCl 0,1N. A fase aquosa foi colocada em três tubos de ensaio (aprox. 5 ml em cada tubo). No primeiro tubo foram adicionadas 3 gotas do reagente de Hager (solução saturada de ácido pícrico). No segundo foram adicionadas 3 gotas do reagente de Mayer (iodomercurato de potássio). No terceiro foi adicionado três gotas do reagente de Dragendorff. A formação de um precipitado floculoso nos três tubos, é indicativo de alcalóides.

4.5.3.1 Testes para bases quaternárias

A solução aquosa reservada no teste anterior (privada dos alcalóides por lavagem com mistura éter-clorofórmio), foi acidulada novamente com HCl 1N para pH 4. Esta solução foi filtrada e colocada em três tubos de ensaio (aprox. 5 ml em

cada tubo). No primeiro tubo foram adicionadas 3 gotas do reagente de Hager (solução saturada de ácido pícrico). No segundo foram adicionadas 3 gotas do reagente de Mayer (iodomercurato de potássio). No terceiro tubo foi adicionado o reagente de Draggendorff. A formação de um precipitado floculoso indica a presença de bases quaternárias.

4.5.3.2 Prospecção dos constituintes do extrato clorofórmico

O extrato clorofórmico seco foi novamente dissolvido em cerca de 200 mL de clorofórmio. As bases orgânicas foram retiradas aplicando a técnica de extração líquido-líquido. O material foi colocado em um funil de separação e extraído três vezes com 30 mL de uma solução de HCl 0,1N. Em seguida foi extraído com 50 mL de água para lavagem final. A base orgânica foi reservada para outros testes. As soluções aquosas foram reunidas e alcalinizadas com NH_4OH conc. gota a gota até pH 11. A solução básica foi extraída com três porções sucessivas de 15, 10 e 5 mL de uma mistura éter/clorofórmio 3:1. A fase aquosa foi reservada para outros testes. A solução éter/clorofórmio foi filtrada e dividida em duas porções. Uma dessas porções foi extraída três vezes consecutivas com 5 mL de HCl 1N através de um funil de separação. A fase aquosa ácida foi filtrada e submetida aos testes descritos abaixo:

4.5.3.3 Testes para alcalóides

A solução ácida obtida no teste anterior foi separada em três tubos de ensaio e adicionada a cada um, três gotas dos reagentes de Hager, Mayer e Draggendorff, respectivamente.

4.5.3.4 Teste para bases quaternárias

A fase aquosa reservada da separação das bases orgânicas foi acidulada com ácido acético até pH 4-5 e adicionado 0,5 mL de reagente de Hager.

4.6 ESTUDO QUÍMICO

4.6.1 Obtenção dos extratos

Folhas secas e moídas da *Dioscorea alata* (450g) foram extraídas com etanol/água (80:20) por três vezes consecutivas, sob agitação mecânica, durante duas horas. O total do extrato obtido foi filtrado, evaporado, deixado em dessecador à vácuo por 48 horas e pesado, obtendo o extrato hidroalcoólico. O resíduo foi extraído com clorofórmio utilizando o mesmo processo anterior, produzindo o extrato clorofórmico. O resíduo foi extraído 3 vezes com hexano, produzindo o extrato hexânico e o resíduo que foi descartado (esquema 1).

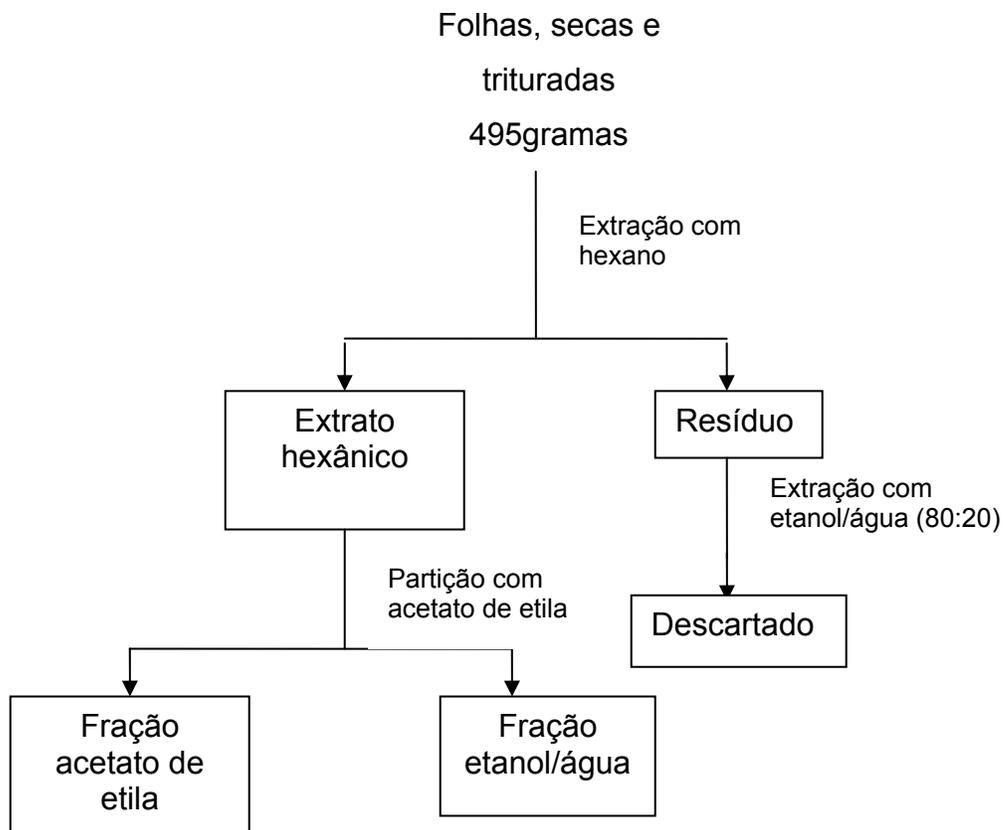
4.6.2 Separação Cromatográfica do extrato hexânico

O extrato hexânico pesando 9,555g foi cromatografado sob coluna, usando sílica gel e o sistema, ciclohexano/acetato de etila 8,5:1,5. De acordo com a coloração apresentada na coluna foram separadas 32 frações de 50 mL cada, que após análise por cromatografia em camada delgada, as frações com os mesmos R_fs foram reunidas.

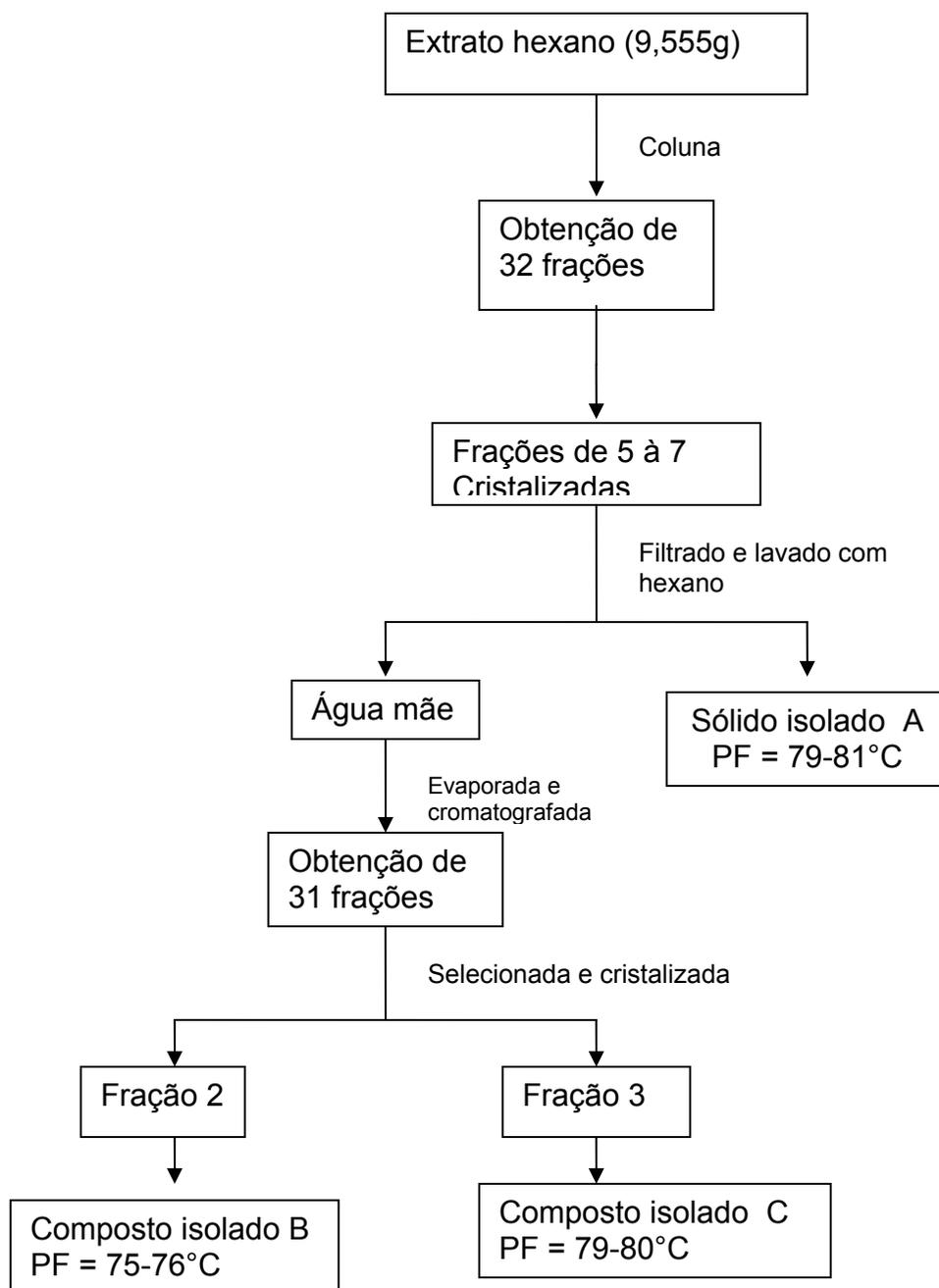
4.6.3 Separação cromatográfica das frações F₅ a F₇ do extrato hexânico

Uma segunda coluna, em sílica gel, foi realizada com as frações de F₅ à F₇ da coluna anterior, usando ciclohexano e acetato de etila 8,5:1,5 como eluente, separando 31 frações. As frações foram comparadas entre si por cromatografia de camada fina e reunidas aquelas de mesmo R_f. As frações F₂ e F₃ desta coluna foram cristalizadas separadamente com hexano, isolando dois compostos (esquema 2).

Os compostos isolados apresentaram cristais brancos, sendo determinado seu ponto de fusão. Os materiais isolados mostraram-se insolúveis em todos os solventes testados. Devido tal insolubilidade um dos compostos foi acetilado .



Esquema – Esquema de extração dos constituintes da *Dioscorea alata*..



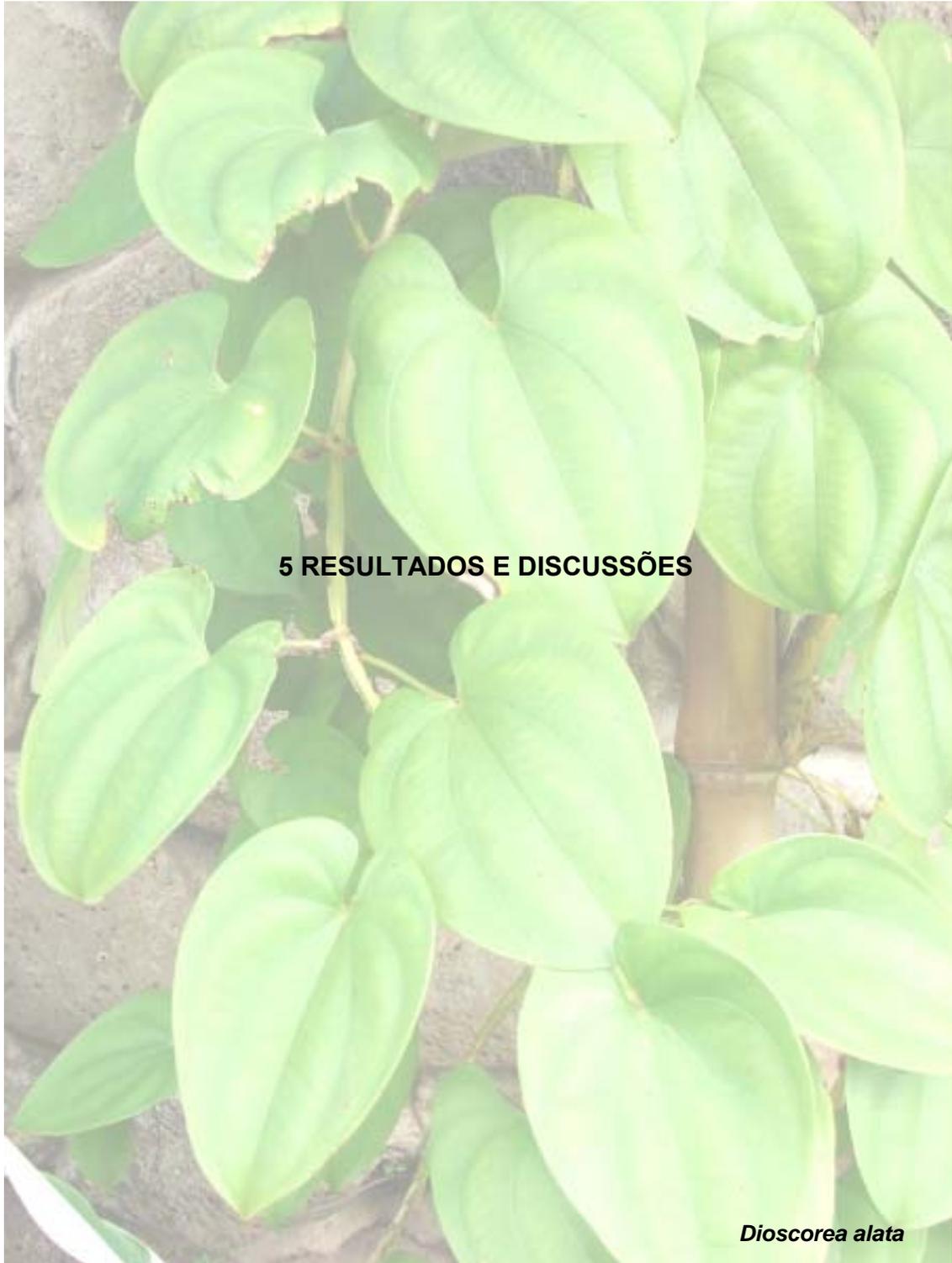
- Esquema 2 - separação cromatográfica

4.6.4 Reação de acetilação com anidrido acético e piridina

Foram pesadas 0,021 g da substância isolada da fração F5 a F7 (0,0649g) e colocada em um balão de fundo redondo. Foi adicionada 2mL de piridina até que a amostra estivesse totalmente dissolvida a quente. Após dissolução do composto, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e observado a elevação da temperatura da mistura. O balão contendo o material foi aquecido a refluxo sob agitação magnética durante uma hora.

Terminada a reação foi adicionada a mistura o mesmo volume de água gelada, onde ocorreu precipitação. O produto foi filtrado, secado e pesado.

Tendo partido de 0,021g da substância, foi obtido 0,007g do produto acetilado.



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dioscorea alata

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ESTUDO MICROBIOLÓGICO

5.1.1 Teste de atividade antimicrobiana

Considerando os extratos apresentados na tabela 6, foi possível observar os resultados da extração com os solventes apolares (hexano e clorofórmio) e polar (hidroalcoólico). O extrato hexânico que é o de mais baixa polaridade, responsável pelo desengorduramento da planta, foi o que apresentou índice mais baixo de inibição, apenas dois microrganismos foram inibidos no teste de difusão em disco, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*, sendo esses halos de 10 mm. Em relação ao extrato clorofórmico este apresentou halos de inibição para seis microrganismos, portanto 300% mais ativo que o anterior. Sabe-se que o clorofórmio apesar de ser pouco polar, tem seu índice de polaridade maior que o do hexano, portanto extraiu maior quantidade de componentes químicos capazes de inibir aqueles microrganismos. Em relação ao extrato polar, (hidroalcoólico), foi observado que inibiu também o crescimento de seis microrganismos, com um índice bem aproximado ao extrato clorofórmico. Dos três extratos analisados apenas o extrato hidroalcoólico apresentou atividade para *Candida albicans*, porém o halo de inibição foi muito baixo, 8 mm. Os demais halos foram inferiores aos do extrato clorofórmico. Dos dez microrganismos testados três deles, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli* e *Monilia sitophila* não apresentaram sensibilidade aos extratos avaliados.

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana de extratos brutos das folhas de *Dioscorea alata* (halo de inibição em mm).

Microrganismo	Extrato hidroalcoólico	Extrato clorofórmico	Extrato hexânico
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	16	0
<i>Micrococcus luteus</i>	10	11	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	18	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	8	8	10
<i>Candida albicans</i>	8	0	0
<i>Monilia sitophila</i>	0	0	0

5.1.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória foi realizada para os compostos que apresentaram halos de inibição iguais ou maiores que 14 mm de diâmetro para pelo menos um dos microrganismos testados. O extrato clorofórmico apresentou os melhores halos de inibição, selecionando para CMI o *Staphylococcus aureus*, que mostrou estar a uma concentração superior a 500 µg/mL.

5.2. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

O estudo nutricional realizado com as folhas da *Dioscorea alata* mostrou bons índices de nutrientes em relação ao tubérculo. Sendo a raiz tuberosa a única parte comestível na planta, seja por humanos ou animais foi importante verificar os índices nutricionais de ambos e compará-los entre si. A folha mostrou ter maiores percentagens nas análises do que o tubérculo para os itens cinzas, fibras, proteínas, lipídeos, fósforo, ferro e sódio. Apenas para os itens valor calórico total, umidade e potássio, ficaram abaixo do tubérculo. Examinando o item fibras, a folha apresentou 42,65% em relação ao tubérculo onde o índice foi de 22,58%, portanto uma diferença de 88,48% em favor da folha. A folha destaca-se em valores nutricionais em relação ao tubérculo, por exemplo, o índice de fósforo apresentado na folha é de 3404,76% portanto um valor considerável. Outros itens que apresentaram valores maiores do que 100% foram proteínas, lipídeos, ferro e sódio. Estes valores estão relacionados na tabela 8. O valor calórico total do tubérculo é de apenas 36,68% maior do que o da folha, e que poderá ser incluída em regimes de alto valor nutricional e baixo valor calórico, e abaixo destes vem umidade, carboidratos, e potássio. Estas percentagens mostram que a folha tem alto valor nutricional e que está sendo desperdiçada, quando poderia ser aproveitada na alimentação humana em forma de farinha, biscoitos, bolachas, bolos ou pães. Para que este material seja acrescentado na alimentação humana é necessário que seja submetido a testes farmacológicos para saber se existe toxicidade e se será liberado para alimentação.

Tabela – 7 Análise da composição nutricional das folhas da *Dioscorea alata*.

ENSAIOS	RESULTADOS (Em base seca)
Valor Calórico Total	172,06 Kcal
Cinzas	9,47%
Proteínas	17,52%
Lipídeos	4,42%
Carboidratos	58,28%
Umidade e Substâncias voláteis	10,31%
Fósforo	22,08%
Ferro	8,83%
Fibra Alimentar	42,65%
Sódio	73,82%
Potássio	45,87%

Tabela – 8. Dados comparativos da análise nutricional das folhas da *Dioscorea alata* com dados do tubérculo.

Ensaio	Folha / 100g (Em base seca)	Tubérculo / 100g (Em base seca)	Diferença em favor da Folha	Diferença em favor do Tubérculo
Valor calórico total	172,06 Kcal	271,77 Kcal	-	36,68%
Fibra	42,65%	22,58%	88,48%	-
Proteínas	17,52%	8,28%	111,59%	-
Cinzas	9,47%	5,52%	71,55%	-
Umidade	10,31%	11,15%	-	7,53%
Lipídeos	4,42%	2,09%	111,48%	-
Carboidratos	58,28%	76,96%	-	24,27%
Fósforo	22,08%	0,63%	3404,76%	-
Ferro	8,83%	4,00%	120,75%	-
Sódio	73,82%	30,70%	140,45%	-
Potássio	45,87%	65,90%	-	30,39%

5.3. ESTUDO RADIOFARMACOLÓGICO

5.3.1. Extrato hidroalcoólico

A figura 3 mostra a captação de tecnécio-99m das células totais com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico. O resultado mostrou que houve um decréscimo na captação de tecnécio-99m na concentração de 6,25% (de 94,06 para 74,82%).

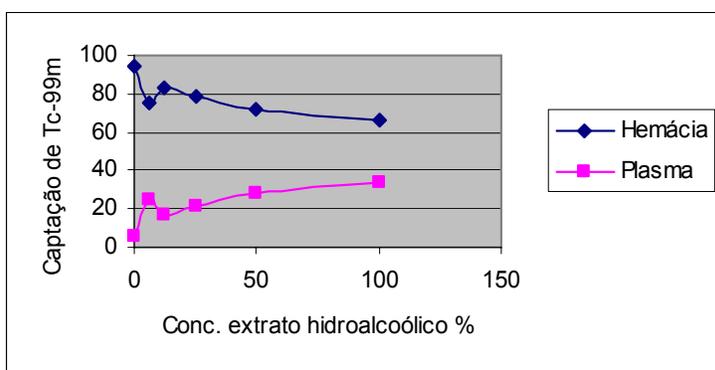


Figura. 3. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Dioscorea alata* das células totais com Tc-99m.

5.3.2. Frações solúveis do plasma e hemácia no extrato hidroalcoólico.

A figura 4 mostra a captação de tecnécio-99m na fração solúvel das células do sangue tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico. O resultado mostrou uma confirmação da figura anterior, onde há um decréscimo da captação de tecnécio-99m na concentração de 6,25% (de 94,59 para 65,20%).

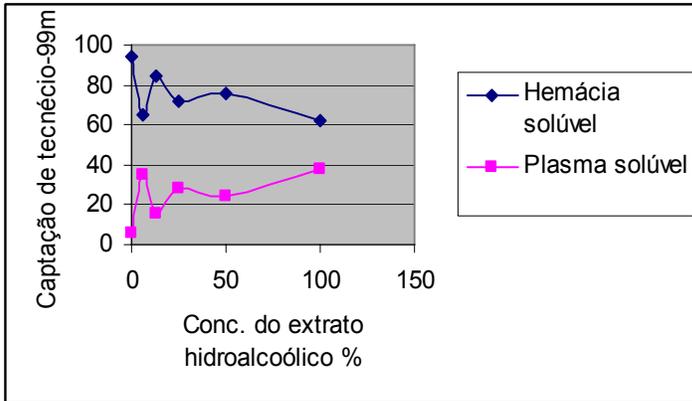


Figura. 4 Efeito da captação de tecnécio-99m do extrato hidroalcoólico da *Dioscorea alata* referente a fração solúvel.

5.3.3. Frações insolúveis do plasma e da hemácia no extrato hidroalcoólico.

A figura 5 mostra a captação de tecnécio-99m na fração insolúvel das células do sangue tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico. O resultado indica que houve um decréscimo da captação de tecnécio-99m na concentração de 6,25% (de 85,00 para 67,88%) e permaneceu constante nas concentrações de 12,50, 25,00, 50,00 e 100%.

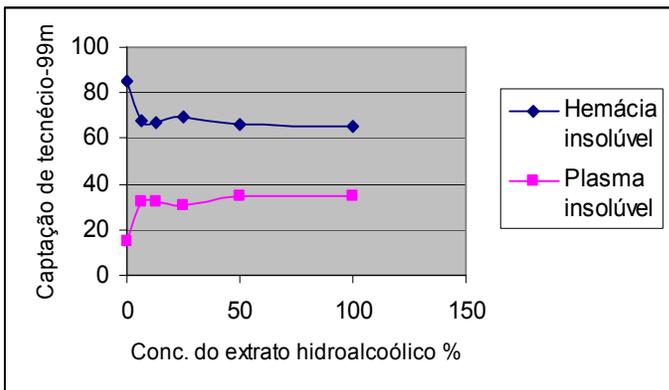


Figura 5. Efeito da captação de tecnécio-99m do extrato hidroalcoólico da *Dioscorea alata* da fração insolúvel das células do sangue.

5.3.4. Extrato clorofórmio

A figura 6 mostra a captação de tecnécio-99m das células totais do sangue tratadas com diferentes concentrações do extrato clorofórmio, solúvel em uma mistura totalizada em 1 mL de clorofórmio + solução salina. O resultado indica que houve um acentuado decréscimo da captação de tecnécio-99m na concentração de 50% (de 91,00 para 21,37%).

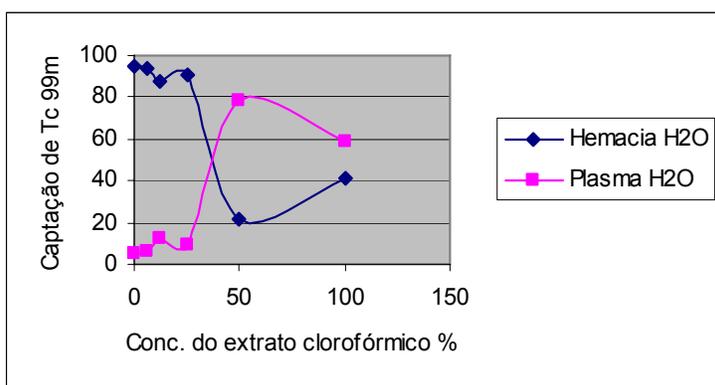


Figura 6. Efeito da captação de tecnécio-99m do extrato clorofórmico da *Dioscorea alata* das células totais do sangue.

5.3.5. Frações insolúveis do plasma e da hemácia no extrato clorofórmio

A figura 7 mostra a captação de tecnécio-99m da fração insolúvel do sangue tratadas com diferentes concentrações do extrato clorofórmico. O resultado mostra uma confirmação da figura anterior, onde houve uma acentuada redução da captação de tecnécio-99m na concentração de 50% (de 91,89 para 33,98%).

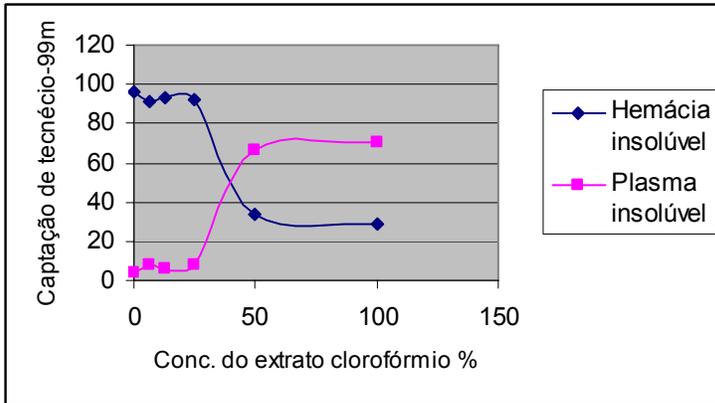


Figura 7. Efeito da captação de tecnécio-99m da fração insolúvel do extrato clorofórmico da *Dioscorea alata*.

5.3.6. Frações solúveis do plasma e da hemácia no extrato clorofórmio

A figura 8 mostra a captação de tecnécio-99m da fração solúvel do sangue do extrato clorofórmico. O resultado mostrou que houve um decréscimo da captação de tecnécio-99m na concentração de 6,25% (de 93,91 para 56,95%).

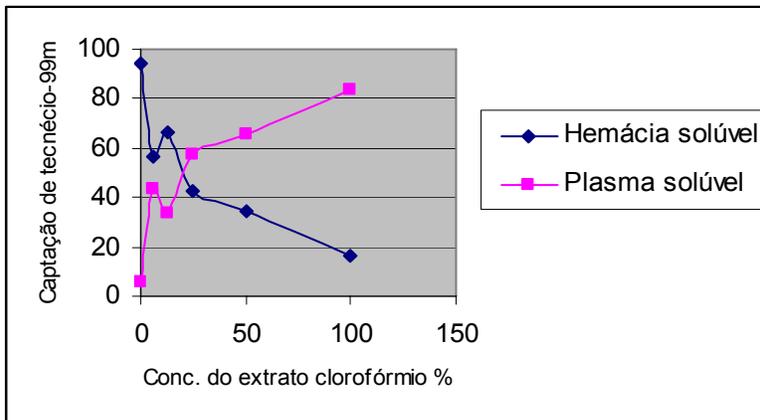


Figura 8. Efeito da captação de tecnécio-99m da fração solúvel do extrato clorofórmico.

5.4. ESTUDO CITOTÓXICO

Foram realizados os testes de citotoxicidade para os extratos hidroalcoólico e clorofórmico da *Dioscorea alata* frente a duas linhagens de células, a Hep-2 (carcinoma Epidermoide de Laringe) e NCI-H 292 (Carcinoma Muco Epidermoide de Pulmão). Dos extratos testados apenas o extrato clorofórmico apresentou atividade citotóxica, onde mostrou inibição de 80,6% da proliferação celular para as células Hep-2 na concentração de 50 µg/mL. Na concentração de 25 µg/mL apresentou inibição de 60,5%, este valor é superior ao que preconiza o protocolo adotado (GERAN *et al.*, 1972). Seguindo o referido protocolo, são considerados ativos extratos vegetais que inibem 50% da proliferação celular em concentrações menores ou igual a 30µg/mL. O extrato hidroalcoólico não apresentou inibição. Os resultados foram obtidos pela CI_{50} , concentração que inibi 50% da proliferação celular em relação ao controle (ADOLPHE *et al*, 1988), e estão relacionados na tabela 9.

Tabela – 9. Atividade citotóxica dos extratos hidroalcoólico e clorofórmico das folhas da *Dioscorea alata* frente as células Hep-2 e NCI-H 292.

Produtos	NCI-H, 292		HEp-2	
	Concentração µg/ml	% Inibição	Concentração µg/ml	% Inibição
Extrato Hidroalcoólico	50,0		10,0	
	25,0		5,0	
	12,5	Negativo	2,5	Negativo
	2,25		1,25	
Extrato Clorofórmico	50,0		50,0	80,6
	25,0		25,0	60,5
	12,5	Negativo	12,5	42,0
	2,25		2,25	33,5

5.5. ESTUDO FITOQUÍMICO

5.5.1. Abordagem fitoquímica para o extrato clorofórmico

Através dos testes de prospecção química pôde-se observar as classes de compostos existentes nas folhas da *Dioscorea alata*, tendo sido detectada apenas saponinas e esteroides livres. Os dados para outras espécies na literatura comprovam esses compostos.

5.5.1.2 Teste para heterosídeos cianogênicos

A fita de papel de picrato de sódio fixada à tampa do Erlenmeyer não mostrou nenhuma mudança de coloração no papel, indicando assim que não houve presença de heterosídeos cianogênicos na planta.

5.5.1.3. Prospecção dos constituintes do extrato hidroalcoólico

5.5.1.4 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Os resultados obtidos foram comparados com a tabela 4 e observados de acordo com a coloração apresentada.

Não houve coloração semelhante com a da tabela indicada na pág. 35, mostrando que não há presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides tanto para o extrato clorofórmico como para o extrato hidroalcoólico.

5.5.1.5. Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

O aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de contituintes especificada na tabela 5.

Não houve formação de coloração semelhante a tabela 5, indicando a ausência de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas para os dois extratos.

5.5.1.6 Testes para confirmação de catequinas

Após o tempo hábil, não houve mudança de coloração no lado do palito que foi acidulado para os dois extratos, indicando que não foi confirmado a presença de catequinas.

5.5.1.7. Testes para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Após o término da reação foi observada uma possível mudança na coloração da solução do tubo contendo o magnésio dissolvido.

Como não houve aparecimento ou intensificação da cor vermelha, indicativa de flavonóis, flavononas, flavanonóis e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos, ficou indicada a ausência destes componentes para os extratos clorofórmico e hidroalcoólico.

5.5.1.8. Testes para esteróides e triterpenóides (Lieberman – Burchard)

Após adicionar ao tubo de ensaio 1 mL de anidrido acético, e três gotas de H_2SO_4 concentrado, foi observado que houve o aparecimento da coloração azul evanescente seguida de verde permanente, indicativa da presença de esteróides livres para o extrato clorofórmico. Para o extrato hidroalcoólico houve a formação de uma leve coloração esverdeada, sendo então um resultado suspeito para esteróides livres.

5.5.1.9. Teste para saponinas

Após agitação do tubo contendo o material não houve a formação de espuma para o extrato clorofórmico, mas para o extrato hidroalcoólico, houve a formação de espuma abundante e permanente, indicando a presença de saponinas neste extrato.

5.5.2. Teste confirmatório para saponinas

Para o extrato clorofórmico foi confirmada a ausência de saponinas não havendo a formação de precipitado, mas para o extrato hidroalcoólico a formação do precipitado e o não aparecimento de espuma, indica a confirmação para este constituinte.

5.5.2.1. Teste para alcalóides

Após exame da fase aquosa, foi observado se havia a formação de precipitado diante dos testes de Hager, Mayer e Draggendorff, não tendo sido constatada formação de precipitado nos 3 tubos, indicando a ausência de alcalóides, tanto para o extrato clorofórmico como para o extrato hidroalcoólico.

5.5.2.2. Teste para bases quaternárias

A solução aquosa reservada no teste anterior, após ser submetida aos reagentes de Hager, Mayer e Draggendorff, mostrou que não apresentou a formação de precipitado, indicando ausência de bases quaternárias para o extrato clorofórmico e também para o extrato hidroalcoólico.

Tabela – 10. Classes de compostos de extratos brutos das folhas da *Dioscorea alata*.

TESTES	EXTRATO HIDROALCOÓLICO	EXTRATO CLOROFÓRMICO
Heterosídeos Cianogênicos	-	-
Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides	-	-
Leucoantocianidinas, Catequinas e Favanonas	-	-
Confirmação de catequinas	-	-
Flavanóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas	-	-
Esteróides e Triterpenóides	Suspeito	+
Saponinas	+	-
Confirmação de saponinas	+	-
Alcalóides	-	-
Bases quaternárias	-	-

Legenda + : positivo

- : negativo

5.6. ESTUDO QUÍMICO

Através das extrações feitas, o extrato hexânico foi selecionado para o estudo químico, com a finalidade de isolar e identificar compostos de baixa polaridade, devido os outros extratos não apresentarem condições favoráveis para o isolamento e identificação de compostos.

Em 495g de folhas, foram obtidas 9,555g de extrato hexânico. Esse extrato foi submetido a três colunas cromatográficas usando sílica gel, ciclohexano e acetato de etila como eluente. Na primeira coluna houve a obtenção de 32 frações. As frações 5 à 7 foram submetidas a segunda coluna e isolada uma substância, branca pesando 0,0649g com ponto de fusão 79-81°C. O material por ser insolúvel foi submetido a acetilação. Partindo de 0,021g de substância, após acetilação rendeu 0,007g, Rf = 0,50 e ponto de fusão 80-82°C.

Os três compostos isolados do extrato hexânico, foram comparados em cromatografia de camada fina e seus Rfs foram iguais, mesmo após ter mudado diversas proporções de sistema. Foi feita a secagem dos compostos em estufa em tempos iguais, onde mostraram uma mesma faixa de ponto de fusão. Mediante este fato os compostos isolados foram considerados iguais.

O espectro de RMN'H mostra que a substância não foi acetilada, uma vez que não mostrou o singlete de grupo CH₃.



6 CONCLUSÕES

Dioscorea alata

CONCLUSÕES

- As folhas da *Dioscorea alata* possuem substâncias ativas, principalmente para bactérias Gram-positivas.
- A CMI do extrato clorofórmico para *Staphylococcus aureus* está acima de 500 µg/ml.
- As folhas de *Dioscorea alata* apresentam um valor nutricional significativo comparado com o tubérculo, podendo ser utilizado como complemento alimentar.
- O estudo radiofarmacológico das folhas da *Dioscorea alata* mostrou a existência de um agente oxidante que impede a marcação de tecnécio-99m, e portanto não apresenta atividade antioxidante.
- Dos testes de atividade citotóxica, apenas o extrato clorofórmico apresentou inibição da proliferação celular para as linhagens de células Hep-2.
- O estudo fitoquímico realizado revelou que as folhas de *Dioscorea alata* apresentam possíveis esteróides livres e saponinas em grande quantidade.
- No estudo químico foi isolada uma substância branca que pelas características, reações e espectros, indica ser um ácido graxo.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dioscorea alata

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMO, M. A. Taioba, cará e inhame: o grande potencial inesperado. São Paulo: Editora Ícone, p. 80, 1990.

ADESANYA, S. A.; OGUNDANA, S. K.; ROBERTS, M. F., **Phytochemistry**, v. 28, pp. 773-774, 1989.

ADESUYI, S. A. The use of gamma radiation for control of sprouting in yams (*Dioscorea rotundata*) during storage. **Nigerian Journal of Plant Protection**, v. 2, pp. 34-39, 1978.

ADOLPHE M., BARLOVATZ-MEIMON, G. Culture de Cellules Animales. Méthodologies Applications. In Ed. INSERN, Paris, 1988.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.**, 48, 589-601, 1988.

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 92303 (32.1.05)
Cinzas- Gravimetric method 2002.

AOAC, 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International. 985.29
Total Dietary Fiber in Foods
Enzymatic-Gravimetric Method
First action 1985
Final action 1986

AOAC, 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International. 963.15
Fat in Products
Soxhlet Extraction Method
Final action 1973.

AOAC, 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International. 991.20
Nitrogen Total
Kjeldahl Methods
First action 1991 Final action 1994

AOAC, 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International 990.23
Sodium and Potassium
Flame Emission Spectrometric Method
First action 1990

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International 970.39
Fósforo Espectrometric Methos 2002.

AOAC, 2002 Official Methods os Analysis of AOAC International
944.02
Ferro Espectrometric Method.

ARAÚJO, F. C. de. Aspectos sobre o cultivo do cará. Recife: EMATER, 33p
(EMATER-PE. Boletim técnico, 29) 1982.

ASCAR, J. M. Alimentos, aspéctos bromatológicos e legais, análise percentual.
EDUNI-SUL, São Leopoldo, RS. P. 327, 1985.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHEVIS, J. C.; TURCK, M., Antibiotic
susceptibility testing by a standardized single disc method. **Amer. J. Clin. Pathol.**,
v.45, pp. 493-496, 1966.

Biodiversidade: Perspectiva e Oportunidades Tecnológicas. Fitoterápicos,
encontrado no site:

<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloint.html>

BONTEMPO, M. Um panorama cultural da utilização terapêutica do inhame
através de diferentes culturas do mundo. "Guia Prático de Alimentação Natural".
Bestseller, p. 60-61, 1994.

BRAGA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; FELICIANO, G. D.; REINIGER, I. W.;
OLIVEIRA, J. S.; SILVA, C. R.; BERNARDO-FILHO, M., **Current Pharmaceutical
Design**. V. 6, pp. 1179-1191, 2000.

COMBATE A TPM. Revista Nova, nº 62. ED Abril, SP, Setembro de 1998.

DONG, M.; FENG, X. Z.; XIANG, B.; WU, L. J., IKEJIMA, T. Two Novel Furostanol
Saponins from the Rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their
Cytotoxic Activity. **Tetrahedron**, v.57, pp. 501-506, 2001.

EAGLE, H. Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. **Science**, v. 130,
pp. 432-437, 1959.

EJECHI, B. O. & SOUZEY, J. A. Inhibition of Biodeterioration of Yam Tuber
Dioscorea rotundata Poir in Storage with Phenolic Extract of *Acalypha hispida*
Burm. f. Leaves. Journal of Stored Products Research, v. 35, pp. 127-134, 1999.

GERAN R. I.; GREENBERG N. H.; McDONALD M. M.; SCHUMACHER A N.&
ABBOT B. J., Protocols for screening chemical agents and natural products against
animal tumors and other biological systems. 1972.

GUTFILEN, B & BERNARDO-FILHO, M., The labeling of red blood cells, leukocytes and plasma proteins with technetium-99m: our practice and retrospective aspects. *Rev. Bras. Pesq. Desenvolv.* v. 1, n. 3, Dezembro, 1996.

GOTTLIEB, O. & KAPLAN, M. A., **Ciências Hoje**, v.15, n. 89, pp. 51-54, Rio de Janeiro, 1993.

HARAGUCHI, M.; SANTOS, A. P. Z.; YOUNG, M. C. M. & PAULO, E. C., Steroidal Prosapogenins from *Dioscorea oifersiana*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, pp.1005-1008, 1994.

HARBONE, J. B., **Biochem. J.**, v.70, p. 22, 1958.

HIRSCH, S. Boca Feliz & Inhame Inhame. Os poderes Terapêuticos do Inhame, 1995.

<http://www.correcotia.com/inhame/index.html>

HORMÔNIO VEGETAL CONTRA A TPM. **Jornal O Dia**. RJ, 2000.

HOUVERT, D.; DIOPOH, J.; KETEKOU, S. F.; MARCHIS-MOUREN, G. & **Physiol. Veg.**, v. 20, p. 45, 1982.

HU, K.; AI-JUN DONG; YAO, X. S.; KOBAYASHI, H. & IWASAKI, S. A Furostanol Glicoside from Rhizomes of *Dioscorea colettii* Var. *Hypoglauca*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, pp.1339-1342, 1997.

IMBERT, M. P. & SEAFORTH, C., **Experientia**, v.24, p. 445, 1968.

KOUASSI, B.; DIOPOH, J. & FOURNET, B. Soluble sugars from yam and changes during tuber storage. **Phytochemistry**, v. 29, n.4, pp. 1069-1072, 1990.

LEET, E., **Phytochemistry**, v. 16, pp. 1705-1709, 1977.

LEVI – STRAUSS, C. A., A Ciência do Concreto. In: O Pensamento Selvagem. **Papirus** Editora, Campinas, pp. 15-50, 1989.

LUTZ, A., Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. São Paulo, SP-Brasil 1985.

MAJUNDER, P. L. & PAL, S., **Phytochemistry**, v. 32, pp. 1561-1565, 1993.

- MANDER, M., Marketing of Indigenous Medicinal Plants in South África. A Case study in KwaZuluNatal. FAO of the UN, Rome, 1998.
- MATERN, U.; KNEUSEL, R. E. , Phenolic compounds in plant disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 16, pp. 153-170, 1988.
- MATOS, F. J. A., Introdução à química experimental. EUFC edições, 2º edição, Fortaleza, 1997.
- MONTALO, A. Cultivo de Raices Y. Tubércuos e tropicales. II CA; San Jose, 408p, 1991.
- MORS, W., Plantas Mediciniais. **Ciências Hoje**, v. 1, n. 3, pp. 51-54, Rio de Janeiro, 1982.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, pp. 55-63, 1983.
- MULHOLLAND, D. A., The Isolation of the Amaryllidaceae Alkaloid Crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, pp. 183-185, 2002.
- MURRAY, R. D. H.; JORGE, Z. D.; KHAN, N. H.; SHAHJAHAN, M. & QUAISUDDIN, M., Diosbulbin D and 8-Epidiosbulbin e Acetate, Norclerodane Diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* Tubers. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, pp. 623-625, 1984.
- NASCIMENTO, S. C.; CORRÊA LIMA, R. M.; CAMPOS TAKAKI, G. M.; DIU, M. B. S. & KOENING, M. L., Citotoxic and Antitumoral Effects of Seaweed Extracts from Notheastern **Coast of Brazil**. v. 29, n. 78-79, 1993.
- NEUWINGER, H. D., African Ethnobotany. Poisons and Drugs. **Chapman & Hall**, London, 1994.
- OGUNDANA, S. K. The control of soft rot of yams in Nigeria. **International Biodeterioration Bulletin**, v. 8, pp. 75-78, 1972.
- OKANLA, E. O.; OYEWALE, J. A. & AKINYANJU, A. Trypanocidal effect of aqueous extract of *Acalypha hispida* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, pp. 233-236, 1990.
- OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C. S.; ÁVILA, A. S.; FONSECA, L. M. B.; GUTFILEN, B. & BERNARDO-FILHO, M. Effect of *Thuya occidentalis* on the Labeling of Red Blood Cells and Plasma Proteins with Technetium-99m. Yale **Journal of Biology and Medicine**. v. 69, pp. 489-494, 1997.

OZO, O. N.; CAYGILL, J. C. & COURSEY, D. G. Phenolics of Five Yam (*Dioscorea*) Species, **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, pp. 329-331, 1984.

PLUMBLEY, R.A. & SWEETMORE, A., Phenolic Compounds and Resistance of Yam (*Dioscorea alata*) to Anthracnose Caused by *Colletotrichum Gloeosporioides*. **Acta Hort.** (ISHS) v. 381, pp. 667-670, 1994.

RASOER, V. & COURSEY, D. G., **Experientia**, v. 23, p. 611, 1967.

SCHENKEL, E. P. O Espaço Das Plantas Mediciniais e Suas Formas Derivadas Na Medicina Científica. **Cad. De Farmácia** v. 1, n. 2, pp. 65-72, 1985.

SHOYAMA, Y.; NISHIOKA, I.; HERATH, W.; UEMOTO, S.; FUJIEDA, K. & OKUBO, H. Two Acylated Anthocyanins from *Dioscorea alata*, **Phytochemistry**, v.29, n. 9, pp. 2922-3001, 1990.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed. Rev. – Porto Alegre/Florianópolis: ED. Universidade/UFRGS/ED.da UFSC, 2001.

STAFFORD, H. A., Activation of 4-hydroxycinnamate hydrolase in extracts from Shorghum. **Plant Physiology**, v. 54, pp. 686-689, 1974.

TSUKUI, A.; KUANO, K.; MITAMURA, T.& TANIMURA, W. **Nippon Nouget Kagaku Kaishi**, v.51, p. 471, 1977.

Valor Calórico Total. Manual nº 74, v.195 do Departamento de Agricultura dos E.U.

II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro, Copyright, 2002 Emepa-pb.

WANASUDERA, J. P. D. & RAVINDRAN, G. Effects of Cooking on the Nutrient and Antinutrient Contents of Yam Tubers (*Dioscorea alata* and *Dioscorea esculenta*). **Food chemistry**, v.45, pp. 247-250, 1992.

WEISENTHAL, L. M.; MARSDEN, J. A.; DILL, P. L. & MACALUSO, C. K., A Novel Dyl Exclusion Method For Testing In Vitro Chemosensitivity Of Human Tumors.**Cancer – Res.**; v. 43, pp. 749-757, 1983.

YOSHIDA, K.; KONDO, T.; KAMEDA, K.; KAWAKISHI, S.; LUBAG, A. J. M.; MENDOZA, E. M. T. & GOTO, T. Structures of Alatanin A, B and C Isolated from Edible Purple Yam *Dioscorea alata*, **Tetrahedron Letters**, v.32, n. 40, pp. 5575-5578, 1991.

ZÁRATE, N. A. H.; VIEIRA, M. C. & MINUZZI, A. Produtividade de Cinco Clones de Inhame, Custos e Uso na Panificação Caseira. **Ciências agrotec.**, Lavras. v. 26, n. 6, pp. 1236-1242, nov. / dez., 2002.



8 ANEXOS

Dioscorea alata

SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Sabemos que o tempo para o desenvolvimento da dissertação é curto, envolvendo apenas um ano, o que torna difícil realizar os estudos microbiológicos, farmacológicos e também isolar e identificar os compostos químicos e novamente testar todas as atividades envolvidas nos testes preliminares.

Assim, sugerimos a continuação desse trabalho com o estudo farmacológico que não pode ser realizado devido ao curto prazo para o desenvolvimento da dissertação, uma vez que a literatura mostra várias atividades farmacológicas em outras espécies da *Dioscorea*.

ESTUDO MICROBIOLÓGICO

Meios de cultura

Para realização dos testes de atividade antimicrobiana foram usados os seguintes meios de cultura.

Bactérias

GL – Glicose levedura

Peptona	10,0g
Extrato de carne	3,0g
NaCl	5,0g
Extrato de levedura	10,0g
Glicose ou dextrose	10,0g
Água destilada	1000 mL
Agar	15,0g

pH = 6,9 à 7,1

Mueller Hinton. “agar”

Infusão de carne	2,9g
Caseína hidrolisada	17,5g
Amida	1,5g
Agar	1,5%
Água destilada esterelizada	1000ml

pH = 7,4

NA – “agar nutritivo”

Peptona	10,0g
Extrato de carne	3,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Água destilada	1000mL

pH = 6,9 à 7,1

BDA

Extrato de batata	1000ml
Glicose dextrose	20,0g
Agar	20,0g

pH = 6,8 à 7,0

Leveduras e fungos filamentosos

Sabouraud – dextrose “agar”

Peptona	10,0g
D (+) Glicose	40,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000mL

pH = 5,6

ESTUDO NUTRICIONAL

Cálculo do teor de umidade.

Registros	A	B
$P_i = \text{Peso Cápsula} + \text{Amostra (g)}$	26,8205	24,5952
$P_o = \text{Peso da Cápsula (g)}$	24,4943	22,5822
$P_a = \text{Peso Amostra Úmida (g)}$	2,3262	2,0130
$P_a = (P_i - P_o)$		
$P = \text{Peso Cápsula} + \text{Amostra Seca}$ (4 horas a 105°C)	26,5800	24,3883

Cálculos

Umidade (g / 100g) $U = \{(P_i - P) \times 100\} / P_a$
Umidade A = $(26,8205 - 26,5800) \times 100 / 2,3262 = 10,34\%$
Umidade B = $(24,5952 - 24,3883) \times 100 / 2,0130 = 10,28\%$
Média (g / 100g) = $10,34 + 10,28 / 2 = 10,31\%$

Cálculo do teor de cinzas.

Registros	A	B
P _i = Peso da cápsula + amostra (g)	26,8205	24,5952
P _o = Tara da cápsula (g)	24,4943	22,5822
P _a = Peso amostra (g) P _a = (P _i - P _o)	2,3262	2,0130
P = Peso cápsula + amostra após 550° (g)	24,7115	22,7754

Cálculos

Cinzas (g / 100g) $C = \{(P - P_o) \times 100\} / P_a$
Cinzas de A = $(24,7115 - 24,4943) \times 100 / 2,3262 = 9,34\%$
Cinzas de B = $(22,7754 - 22,5822) \times 100 / 2,0130 = 9,59\%$
Média (g / 100g) = $9,34 + 9,59 / 2 = 9,47\%$

Cálculos para o teor de nitrogênio

Registros	A	B
I = Recipiente + Amostra (g)	1,0052	1,0400
II = Tara do Recipiente (g)	0,1838	0,1802
Po = Peso Amostra (g) Pa = (I – II)	0,8214	0,8598
V = Volume de HCl (ml)	16,7	18,0

Cálculos

Proteína: (g/100g) $P = V \times f \times 0,14 \times F / Pa$
f = fator da solução de HCl 0,1N
F = fator de correspondência Nitrogênio-Proteína
Proteína de A = $16,7 \times 0,9708 \times 0,14 \times 6,25 / 0,8214 = 17,27\%$
Proteína de B = $18,0 \times 0,9708 \times 0,14 \times 6,25 / 0,8598 = 17,78\%$
Média (g / 100g) = $17,27 + 17,78 / 2 = 17,52\%$

Cálculos para o teor de lipídeos

Registros	A	B
C _i = Peso do cartucho + amostra (g)	2,1882	2,5844
Co = Tara do cartucho (g)	0,7119	0,6680
Pa = Peso amostra (g), Pa = (C _i – Co)	1,4763	1,9164
Bo = Tara do balão (g)	61,4372	78,6177
B _i = Peso do balão + extrato (g)		
P = Peso do extrato (g), P= B _i – Bo)	61,3755	78,5281

Cálculos

Extrato Etéreo (g / 100g)	$L = (P / Pa) \times 100$
Extrato etéreo A = (61,4372 – 61,3755) x 100 / 1,4763 = 4,18%	
Extrato etéreo B = (78,6177 – 78,5281) x 100 / 1,9164 = 4,67%	
Média (g / 100g) = 4,18 + 4,64 / 2 = 4,42%	

Cálculos para determinação de carboidratos

V = Carboidratos (g/100g)	$C = 100 - (I + II + III + IV)$
$C = 100 - (10,31 + 9,47 + 17,52 + 4,42) = 58,28\%$	

Cálculos do valor calórico total (V.C.T.)

VI = V.C.T. (Kcal / 100g)	$V.C.T. = (III \times 4) + (IV \times 9) + (V \times 4)$
$V.C.T. = (17,52 \times 4) + (4,42 \times 9) + (58,28 \times 4) = 342,98 \text{ Kcal /100g}$	

Determinação de ferro

Reagentes:

Ácido clorídrico 1N – HCl

Sulfato ferroso amoníaco – $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

Hidroquinona

Sulfato de sódio anidro – Na_2SO_3 20%

Fenantrolina

Acetato de amônia – CH_3OONH_4 – 20%

Determinação de Fibra

Reagente:

α -amilase estável ao calor

Protease

Amiloglucosidase

Celite lavagem ácida

Éter de petróleo P. A.

Etanol 98% v/v

Acetona P. A.

Fosfato de sódio dibásico anidro

Fosfato de sódio monobásico anidro

Hidróxido de sódio 1N

Ácido clorídrico 1M