

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

ALINE SAVI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE
POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DE CARÁ-MOELA (*Discorea bulbifera*).**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2018

ALINE SAVI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE
POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DE CARÁ-MOELA (*Dioscorea bulbifera*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” - Área do conhecimento: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias
Teixeira.

Co-orientador: Dr. Edimir Andrade Pereira

PATO BRANCO
2018

S267c

Savi, Aline.

Caracterização química, potencial antimicrobiano e antioxidante de polissacarídeo extraído de cára-moela (*Discorea bulbifera*). -- 2018.
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2017.

Bibliografia: f. 60 - 70.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Antioxidantes. 3. Polissacarídeos. 4. Análise térmica. I. Teixeira, Sirlei Dias, orient. II. Pereira, Edimir Andrade, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

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



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



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 65

Título da Dissertação

**Caracterização Química e Microbiológica do Polissacarídeo Extraído do Cará-Moela
(*Dioscorea bulbifera*)**

Autora

Aline Savi

Esta dissertação foi apresentada às 14h do dia 23 de fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira
UTFPR/PB
Orientadora

Profa. Dra. Vidianny Queiroz
UTFPR/PB
Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez
Examinador
IFPR/Capanema

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

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e saúde para concluir esse mestrado.

Aos meus pais, João e Genercir, e meu irmão Anderson pelo apoio incondicional e pelo carinho. Ao Roberto por me aguentar durante esse tempo e por sempre me dar forças para continuar.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias Teixeira, pela oportunidade, apoio, compreensão, ensinamentos e por acreditar neste trabalho. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira por todas as contribuições.

Especialmente agradeço, as minhas amigas e colegas de laboratório, Vidianny e Gabrielle, por todo apoio e ensinamentos durante o projeto, sem a ajuda de vocês não conseguiria concluir o trabalho. À Suelen que também me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, na pessoa do Diego, pelas análises instrumentais.

Aos meus amigos, Matheus, Diego, Aline, Jhennifer, Marcelle, Silvia, Maria Fernanda, Michel, Tiago, Renan, Cristiano, Rose, Camila, Samara, Elisandro, Kamila, Roberta, e a pequena Lorena, pela parceria em todas as horas.

Aos professores Mario A. A. Cunha e Rodrigo H. Valdez pelas contribuições.

À Fundação Araucária pelo auxílio Financeiro.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.” - Albert Einstein

RESUMO

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

O cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) é uma hortaliça não convencional que armazena substâncias de reserva em um caule aéreo modificado, e por possuir potencial nutritivo vem sendo utilizado na culinária como substituto de tubérculos tradicionais que possuem importância social e econômica como a batata inglesa e a batata doce. Há relatos na literatura que apontam para a presença de compostos de interesse biotecnológico, como saponinas, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos, taninos, glicosídeos, alcaloides, oxalatos, ácidos orgânicos e principalmente polissacarídeos. Para suprir as necessidades de informações sobre as propriedades dos carboidratos e suas aplicações industriais, os polissacarídeos, presentes no tubérculo do cará-moela, em estado bruto e pré-purificado, foram caracterizados quimicamente por meio de diferentes técnicas instrumentais, bem como, tiveram sua capacidade antioxidante e antimicrobiana determinada. Por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível comprovar que as amostras analisadas são formadas por macromoléculas poliméricas. Os espectros de Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) apresentaram uma banda de absorção bem definida para hidroxilas (OH), característica de polissacarídeos. A utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possibilitou conhecer a morfologia das amostras, as quais são compostas por películas ou "folhas". Além disso, por Difração de Raios X (DRX) foi observado que as amostras em sua maioria são compostas por material amorfo, apresentando picos de cristalinidade em aproximadamente $21,54^\circ$ e $23,62^\circ$ 2θ . A análise térmica detectou três regiões de perda de massa no polissacarídeo não dialisado (PND) e dialisado (PD), nas temperaturas de 100 e 150; 150 e 175; e 550 e 425 $^\circ\text{C}$, respectivamente; associadas principalmente a desidratação da amostra e à decomposição da matéria orgânica, restando uma certa quantidade de cinzas. Também foi possível determinar a matéria orgânica presente nas amostras que foi de aproximadamente 90,80 e 89,50%, na devida

ordem. Interessante atividade antioxidante foi detectada por DPPH, ABTS, FRAP, remoção do radical OH, remoção do H₂O₂ e poder redutor, porém não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos 20 microrganismos testados. Os resultados obtidos neste estudo permitiram caracterizar preliminarmente o polissacarídeo da *D. bulbifera*, dados estes não encontrados em todo o levantamento bibliográfico realizado. Além disso, tais resultados podem nortear trabalhos futuros com a aplicação deste material industrialmente, como filmes biodegradáveis, em excipientes farmacêuticos, e no encapsulamento de compostos nutracêuticos.

Palavras-chave: RMN, MEV, IVTF, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

SAVI, Aline. **Chemical characterization, antimicrobial and antioxidant potential of polysaccharide extracted from gizzard (*Dioscorea bulbifera*).** 2018. 80p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2018.

Dioscorea bulbifera is an unconventional vegetable that stores reserve substances in a modified aerial stem, and because it has nutritional potential, has been used in cooking as a substitute for traditional tubers that have social and economic importance such as potatoes and the sweet potato. There are reports in the literature that point to the presence of compounds of biotechnological interest, such as saponins, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, tannins, glycosides, alkaloids, oxalates, organic acids and mainly polysaccharides. To meet the needs of information on the properties of carbohydrates and their industrial applications, the polysaccharides, present in the raw and pre-purified carcass of the gizzard were characterized chemically by means of different instrumental techniques, as well as their antioxidant and antimicrobial capacity. By means of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) it was possible to prove that the analyzed samples are formed by polymeric macromolecules. The Fourier Transform Infrared (IV-TF) spectra presented a well defined absorption band for hydroxyls (OH), characteristic of polysaccharides. The use of Scanning Electron Microscopy (SEM) made it possible to know the morphology of the samples, which are composed of films or "sheets". Moreover, by X-ray diffraction (XRD) it was observed that the samples are mostly composed of amorphous material, with peaks of crystallinity at approximately 21.54° and 23.62° 2θ . Thermal analysis detected three regions of mass loss in the non-dialysed polysaccharide (PND) and dialysate (PD) at temperatures of 100 and 150; 150 and 175; and 550 and 425 °C, respectively; associated mainly with sample dewatering and organic matter decomposition, leaving a certain amount of ash remaining. It was also possible to determine the organic matter present in the samples, which was approximately

90.80 and 89.50%, in due order. Interesting antioxidant activity was detected by DPPH, ABTS, FRAP, removal of the OH radical, removal of H₂O₂ and reducing power, but did not present antimicrobial activity against the 20 microorganisms tested. The results obtained in this study allowed preliminary characterization of the *D. bulbifera* polysaccharide, data not found in the entire bibliographic survey. Moreover, such results may guide future work with the application of this material industrially, as biodegradable films, in pharmaceutical excipients, and in the encapsulation of nutraceutical compounds.

Keywords: NMR, MEV, FTIR, DPPH, ABTS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A: Tubérculo de Cará-moela antes da colheita; B: Tubérculo de Cará-moela após a colheita; C: Flores produzidas pelo cará-moela. Coletados no mês de abril de 2017.....	23
Figura 2 - Exemplos de antioxidantes; (A) α -caroteno, (B) estilbeno, (C) cumarina e (D) tanino hidrolisável.....	25
Figura 3 - Subdivisões do grupo dos compostos fenólicos, baseado em BOROSKI et al. (2015).	26
Figura 4 - Exemplos de compostos fenólicos, (A) flavonol, (B) flavona, (C) flavanol, (D) flavanona, (E) antocianidina e (F) isoflavonoide.....	27
Figura 5 - Reação entre o radical DPPH e um antioxidante padrão.....	28
Figura 6 - Reação entre o radical ABTS e um antioxidante padrão.	29
Figura 7 - Redução do complexo de TPTZ Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um antioxidante genérico.	30
Figura 8 - Reação de hidroxilação do salicilato de sódio.	31
Figura 9 - Redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} por um antioxidante.....	32
Figura 10 - Cará-moela (esquerda) recém cortado e (direita) após 1 hora de exposição ao oxigênio.....	34
Figura 11 - Polissacarídeo imerso em etanol (A) e polissacarídeo após precipitação com etanol (B).....	36
Figura 12 - PND (A) e PD (B), ambos após liofilização.....	44
Figura 13 - RMN ^{13}C da amostra PND.	45
Figura 14 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier do (A) PND e (B) PD extraído do tubérculo de cará-moela.....	46
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura do (A) PND e (B) PD, ampliação de 200 vezes.....	48
Figura 16 - Difratoograma de Raio-X do PND e PD.....	49
Figura 17 - Curvas TGA, DTA e DTG do PND.....	50
Figura 18 - Curvas TGA, DTA e DTG do PD.....	51
Figura 19 -Remoção do radical hidroxila pelas amostras PND, PD, vitamina C (Vc) e Glicose (G).	55
Figura 20 - Remoção de H_2O_2 pelas amostras PND e PD e dos controles positivos	

e negativos, Vitamina C (Vc) e Glicose (G).....	56
Figura 21 - Poder redutor das amostras PND, PD, Vitamina C (Vc) e Glicose (G).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos microrganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana das amostras.....	42
Tabela 2 - Resultados obtidos para a atividade antioxidante, pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP das amostras PD e PND.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzolna-6-ácido sulfônico)
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Reflectância Total Atenuada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CP	Cross-Polarization
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX	Difração de Raios X
DTA	Differential Thermal Analysis
DTG	Derivative Thermogravimetry
FRAP	Potencial Redutor do Ion Férrico
FTIR	Frontier Transform Infrared Spectroscopy
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PD	Polissacarídeo Dialisado
PND	Polissacarídeo Não Dialisado
RMN	Resonância Magnética Nuclear
RPM	Rotação por Minuto
TCA	Ácido Tricloroacético
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TGA	Thermogravimetry Analysis
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 referencial teórico.....	20
3.1 Produtos naturais	20
3.1.3 Polissacarídeos	21
3.2 Cará-moela (<i>Dioscorea bulbifera</i>).....	21
3.3 Atividade Antioxidante	24
3.3.1 Sequestro do radical DPPH.....	27
3.3.2 Captura do radical ABTS.....	28
3.3.3 Método de redução do ferro - FRAP.....	29
3.3.4 Atividade de sequestro de Radical Hidroxila (HO•)	30
3.3.5 Atividade de remoção de H ₂ O ₂	31
3.3.6 Poder Redutor	31
3.4 Atividade Antimicrobiana	32
4 MÉTODOS	34
4.1 Coleta e Identificação do Material Botânico	34
4.2 Branqueamento.....	34
4.3 Tratamento com etanol.....	35
4.4 Extração do polissacarídeo do cará moela (<i>D. bulbifera</i>).....	35
4.5 Caracterização Química	36
4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C.....	37
4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	37
4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
4.5.4 Difratomia de Raio-X.....	37
4.5.5 Análise Térmica.....	38
4.6 Atividade Antioxidante	38
4.6.1 Atividade Antioxidante pelo Método DPPH	38
4.6.2 Atividade Antioxidante pelo Método de Captura do Radical ABTS.....	39
4.6.3 Atividade antioxidante pelo método FRAP	39

4.6.4 Atividade de sequestro do Radical Hidroxila	40
4.6.5 Atividade de remoção de H ₂ O ₂	40
4.6.6 Poder Redutor	41
4.7 Atividade Antimicrobiana.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Extração	44
5.1 Caracterização Química	44
5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C.....	44
5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	45
5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
5.1.4 Difratomia de Raio-X.....	48
5.1.5 Análise Térmica.....	50
5.2 Atividade Antioxidante	52
5.2.1 DPPH, ABTS e FRAP.....	52
5.2.2 Remoção do radical OH	54
5.2.3 Remoção de H ₂ O ₂	56
5.2.4 Poder redutor	57
5.3 Atividade Antimicrobiana.....	58
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES.....	71

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, diversas culturas e povos já faziam uso de plantas ou produtos derivados de plantas para o tratamento de diferentes doenças, tanto em seres humanos quanto em animais. Nos últimos anos, inúmeras espécies conhecidas de plantas vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de fármacos e produtos benéficos à saúde humana (BIESKI et al., 2015; ABBASI et al., 2013).

O Brasil, por ser um país de dimensão continental, tem um enorme potencial biotecnológico, em função da grande biodiversidade da fauna e flora. (HEINZMANN; DE BARROS, 2007). O estudo e caracterização de plantas e de produtos derivados das mesmas, a fim de identificar novos compostos bioativos e elucidar os mecanismos de ação dos mesmos são de fundamental importância tecnológica.

O cará-moela (*D. bulbifera*) é uma hortaliça não convencional, oriunda dos continentes asiático e africano, que foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses. Produz um caule de reserva que é utilizado na culinária como substituto da batata inglesa em algumas localidades, porém ainda é pouco conhecido e por isso, apresenta baixo valor comercial (BRASIL; 2010). Na literatura científica os relatos sobre as propriedades químicas deste tubérculo ainda são limitadas, mas alguns indicam a presença de saponinas, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos, taninos, glicosídeos, alcaloides, oxalatos, ácidos orgânicos e polissacarídeos (YANG et al., 2016; ADEOSUN et al., 2016; CO; KALOWOLE;AWA, 2012; OGBUAGU, 2008; SHAJEELA; TRESINA; MOHAN, 2013).

Os polissacarídeos naturais têm despertado interesse biotecnológico, pois alguns apresentam capacidade imunomoduladora, antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, hipoglicemiante e antiviral (MENG; LIANG; LUO, 2016; SHI, 2016; XIE et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Neste trabalho, propõem-se a obtenção e purificação do polissacarídeo

presente na *D. bulbifera*; a caracterização da molécula por IV-TF, MEV, DR-X, Análise térmica e RMN e a avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana do polímero, a fim de obter informações específicas acerca do polissacarídeo presente no cará-moela, visando agregar valor a esta hortaliça não convencional, considerando não somente seu valor nutricional, mas também pelas potenciais propriedades bioativas, especialmente as antioxidantes e antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair, caracterizar quimicamente e avaliar potenciais biotecnológicos (atividade antioxidante e antimicrobiana) do polissacarídeo extraído do tubérculo do cará-moela (*Dioscorea bulbifera*).

2.2 Objetivos específicos

- Extrais o polissacarídeo presente no tubérculo do cará-moela (*D. bulbifera*), bem como dialisar o mesmo, visando uma pré-purificação do polissacarídeo.
- Caracterizar o polissacarídeo extraído do tubérculo do cará-moela (*D. bulbifera*) e o polissacarídeo dialisado, pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difractometria de Raio-x (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) e análise térmica.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do polissacarídeo de cará-moela (*D. bulbifera*) e do polissacarídeo dialisado, pelos métodos de sequestro do radical DPPH; captura do radical ABTS; poder redutor do ferro – FRAP; remoção do radical OH; remoção do H₂O₂ e poder redutor.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do polissacarídeo extraído de *D. bulbifera* e do polissacarídeo dialisado, pelo método de disco difusão frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras e bolores (fungos filamentosos).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produtos naturais

Desde os primórdios da civilização o ser humano utiliza as plantas de diferentes formas, seja pra alimentação, remédios, abrigo, roupa, caça, pintura corporal, além de cerimônias religiosas. Todos os costumes e informações sobre a obtenção e utilização desses produtos naturais foram passados através das gerações, porém a grande maioria destas informações é pouco documentado, principalmente no que diz respeito ao conhecimento retido pelas comunidades indígenas (BIESKI et al., 2015; ABBASI et al., 2013; KOSE, MOTEETEE, VUUREN, 2015; MALIK et al., 2015).

O Brasil é um dos países com maior extensão territorial do mundo e isso contribui para que seja o país com maior diversidade genética vegetal do mundo. Apesar da infinidade de plantas aqui existentes, apenas uma pequena parcela foi catalogada e estudada; sabe-se menos ainda sobre os compostos bioativos presentes nessas plantas, por isso acredita-se que muitos produtos naturais ainda serão descobertos e estudados (HEINZMANN; DE BARROS, 2007).

Os produtos naturais podem trazer inúmeros benefícios aos seres vivos, estudos mostram que esses compostos podem ter atividade antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica, anti-inflamatória, antiespasmódica, anticancerígena e ainda, podem diminuir a incidência de hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares (ALENISAN et al., 2017; FELIPE et al., 2017; ZHA, 2017).

O aumento da preocupação em relação a saúde e bem estar pelos consumidores, aliado aos resultados obtidos em pesquisas científicas, faz com que um novo contexto de valorização de produtos naturais frente aos industrializados vem se consolidando. Nos últimos tempos essa busca por produtos benéficos a saúde faz com que as indústrias também busquem oferecer esse tipo de produto aos consumidores, o que influencia na busca por produtos naturais que possam ser utilizados em suas formulações.

3.1.3 Polissacarídeos

Polissacarídeos são resultado da condensação de um grande número de aldoses e cetoses, possuem elevado peso molecular, e grande complexidade estrutural; podendo ter inúmeros compostos orgânicos em sua estrutura e algumas vezes, compostos inorgânicos também estão presentes (SIMÕES et al., 2010; LE COSTAOUËC et al., 2017) .

Os polissacarídeos podem ser extraídos de diferentes matérias primas, incluindo fungos, bactérias e plantas. Os polissacarídeos proveniente de plantas (polissacarídeos vegetais) podem estar presentes em algas, exsudato de plantas, sementes, frutas, cereais e tubérculos (DA CUNHA et al., 2009).

Os polissacarídeos vegetais tem função estrutural e de reserva de energia (DEWICK, 2002) e são divididos em homogêneos ou homoglicanos, quando resultam da condensação de várias moléculas do mesmo açúcar (amido e celulose) e heterogêneos ou heteroglicanos, quando diferentes tipos de açúcares sofrem condensação (gomas, mucilagens e pectinas) (SIMÕES et al., 2010).

Os polissacarídeos naturais têm despertado grande interesse nos últimos tempos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, além de serem empregados nas indústrias alimentícias, médica, farmacêutica e na produção de papel (LIU; WILLFÖR; XU, 2015). Além disso, estudos mostram que alguns polissacarídeos naturais possuem atividade antitumoral (MENG; LIANG; LUO, 2016; SHI, 2016; XIE et al., 2016; ZHANG et al., 2016), antiviral , anti-inflamatória, anticomplemento (SHI, 2016), hipoglicemiante (WANG et al., 2016; XIE et al., 2016; ZHANG et al., 2016), imunomoduladora (MENG; LIANG; LUO, 2016; XIE et al., 2016; ZHANG et al., 2016), antioxidante (XIE et al., 2016; ZHANG et al., 2016), radioprotetora e hepatoprotetora (ZHANG et al., 2016)

3.2 Cará-moela (*Dioscorea bulbifera*)

O cará-moela (*D. bulbifera*) foi introduzido no Brasil pelos portugueses, os quais trouxeram-no da Ásia e África na época das grandes navegações. É um tubérculo classificado como uma hortaliça não-convencional, pois seu cultivo é restrito à algumas regiões e por isso, possui pouco interesse comercial apesar da influência na alimentação e cultura destes locais (BRASIL; 2010). A *D. bulbifera* produz tubérculos aéreos, que são consumidos em substituição à batata inglesa, na região oeste de Santa Catarina e sudoeste do Paraná.

Na Figura 1A podemos observar a planta do tipo trepadeira do cará-moela, o qual apresenta folhas grandes quando em estágio avançado de crescimento; a Figura 1B mostra o tubérculo produzido pela *D. bulbifera* após a colheita. O tubérculo apresenta casca com coloração que varia entre verde e marrom e interior com coloração de branco a verde claro. A Figura 1C apresenta as flores produzidas pela planta - a presença das mesmas foi observada durante todo o mês de abril de 2017 - elas têm, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento, possuem coloração branca e odor semelhante ao do jasmim. A *D. bulbifera* pode produzir o ano todo, em locais onde o inverno não é rigoroso.

Figura 1 - A: Tubérculo de Cará-moela antes da colheita; B: Tubérculo de Cará-moela após a colheita; C: Flores produzidas pelo cará-moela. Coletados no mês de abril de 2017.



Fonte: Autoria Própria.

No momento em que o tubérculo do cará-moela sofre qualquer injúria mecânica (corte, raspagem, etc) que cause o rompimento de sua casca ele sofre um rápido escurecimento enzimático, além de liberar mucilagem.

O polissacarídeo extraído da *D. bulbifera* ainda é pouco estudado e não possui uma estrutura química definida. Porém, relatos sugerem que o mesmo possui atividade antitumoral (CUI, 2012; WEI et al., 2014; CUI et al., 2016).

Estudos envolvendo o tubérculo de *D. bulbifera* também são escassos, segundo os poucos trabalhos encontrados, o cará-moela apresenta em sua composição, saponinas (YANG et al., 2016), taninos, flavonoides, terpenoides, glicosídeos cardíacos (ADEOSUN et al., 2016), alcaloides (CO; KALOWOLE;.AWA, 2012) e oxalato (OGBUAGU, 2008), além de ácidos orgânicos como o ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico (SHAJEELA; TRESINA; MOHAN, 2013).

Extratos do tubérculo de *D. bulbifera* apresentaram atividade antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Citrobacter freundii* (ADEOSUN et al., 2016); e atividade antifúngica sobre *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii* (CO; KALOWOLE; AWA, 2012), além de se apresentar efeito anti-hiperglicêmico, anti-dislipidêmico (AHMED et al., 2009) e antitumoral (WANG et al., 2012).

Os estudos citados acima nos mostram que o tubérculo de cará-moela e seus extratos apresentam muitos compostos químicos e atividades biológicas interessantes, resta saber se o polissacarídeo extraído do mesmo possui o mesmo potencial biotecnológico.

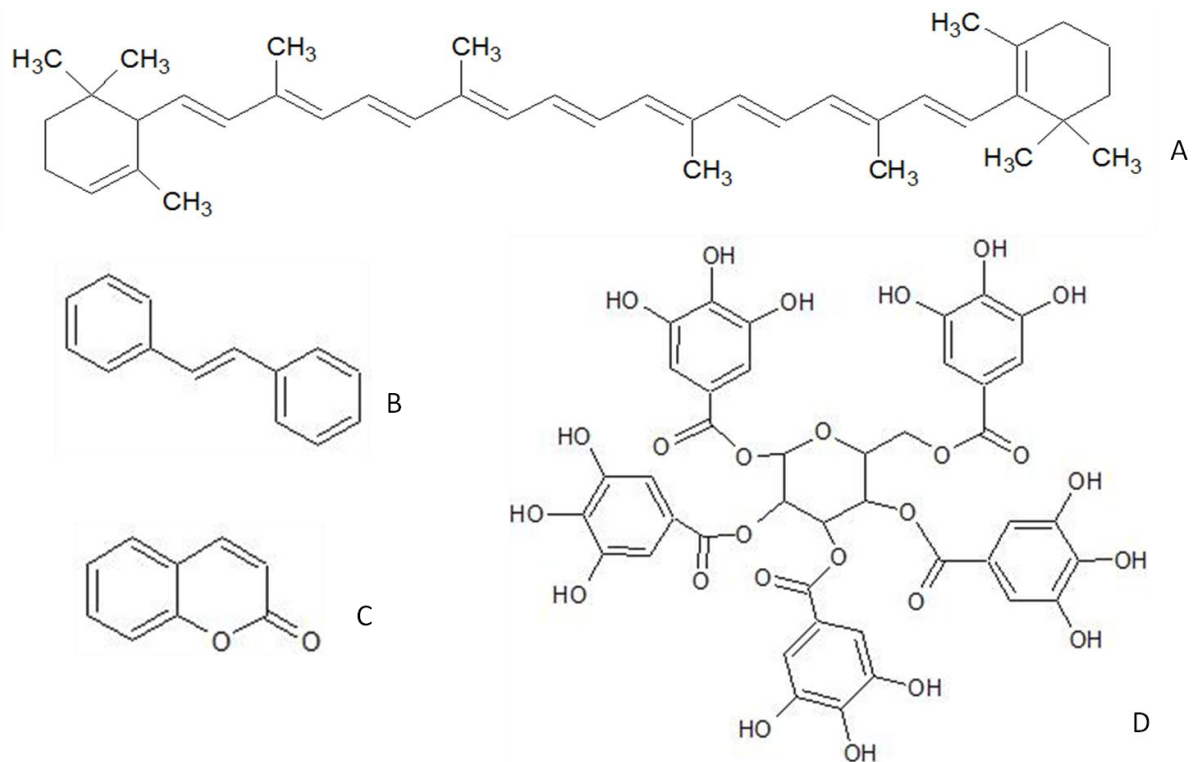
3.3 Atividade Antioxidante

Segundo Sies; Stahl (1995), antioxidante é: "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz".

Existem dois tipos de antioxidantes, os naturais e os sintéticos; os antioxidantes naturais são produto do desenvolvimento das plantas, enquanto que os antioxidantes sintéticos são produzidos em laboratórios. Os antioxidantes naturais estão despertando um grande interesse por parte das indústrias devido aos inúmeros benefícios que os mesmos trazem à saúde humana (BOROSKI et al., 2015).

Segundo BOROSKI et al., (2015), há uma infinidade de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, os quais são divididos em cinco grandes grupos que incluem os carotenoides (Figura 2A), estilbenos (Figura 2B), cumarinas (Figura 2C), taninos (Figura 2D) e compostos fenólicos de uma maneira geral.

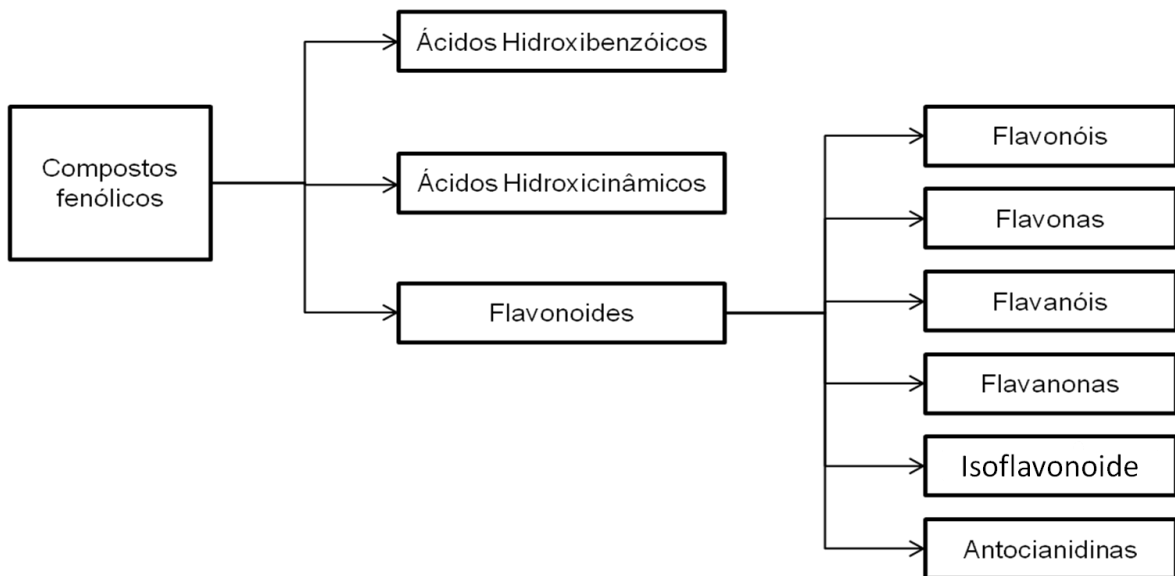
Figura 2 - Exemplos de antioxidantes; (A) α -caroteno, (B) estilbeno, (C) cumarina e (D) tanino hidrolisável.



Fonte: Autoria própria.

O grupo dos compostos fenólicos pode ser dividido em diversas classes, como apresentado na Figura 3.

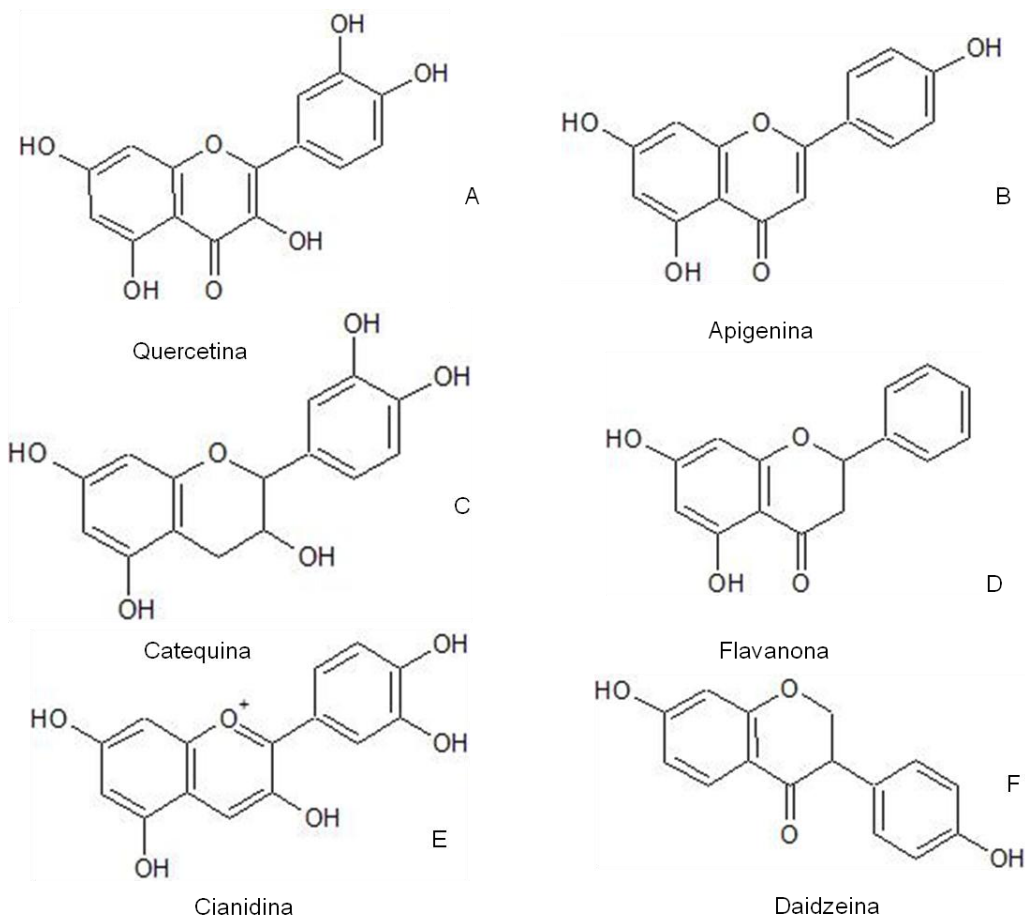
Figura 3 - Subdivisões do grupo dos compostos fenólicos, baseado em BOROSKI et al. (2015).



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 4 são apresentados exemplos das diferentes classes de compostos fenólicos.

Figura 4 - Exemplos de compostos fenólicos, (A) flavanol, (B) flavona, (C) flavanol, (D) flavanona, (E) antocianidina e (F) isoflavonoide.



Fonte: Autoria própria.

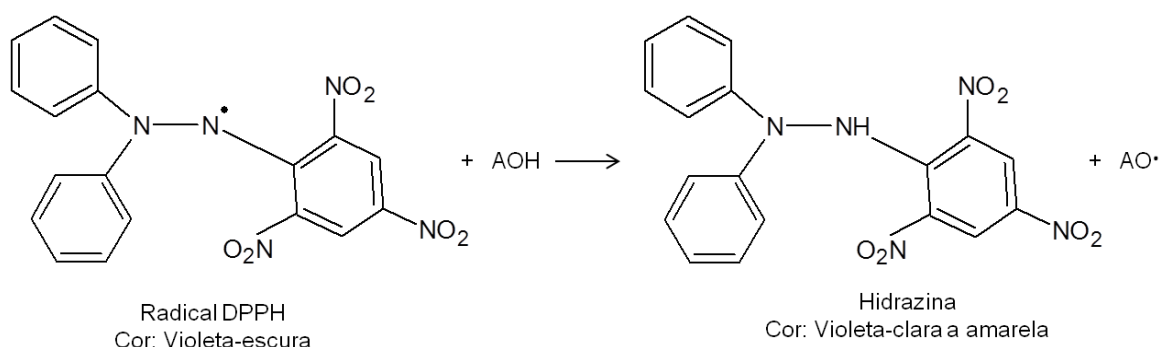
Há vários métodos para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, dentre eles destacam-se o sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS, método da redução do ferro - FRAP, sequestro do radical hidroxila, remoção de peróxido de hidrogênio e poder redutor (LIU et al., 2010; BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2016; RAZA et al., 2016; ZENG et al., 2016).

Cada metodologia é capaz de determinar apenas alguma(s) classe(s) de composto(s) com atividade antioxidante presentes nas amostras. Daí a importância de se utilizar de diferentes metodologias a fim de se obter resultados mais confiáveis.

3.3.1 Sequestro do radical DPPH

A molécula do DPPH contém um elétron livre, portanto é uma molécula radicalar. O método de sequestro do radical DPPH mede a capacidade de uma substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 5), reduzindo o mesmo à hidrazina. Quando uma substância doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução alcóolica de DPPH, a hidrazina é obtida e então ocorre uma mudança na coloração de violeta para amarelo pálido, promovendo um decréscimo na absorbância da amostra em comprimento de onda de 517 nm (ALVES et al., 2010).

Figura 5 - Reação entre o radical DPPH e um antioxidante padrão.



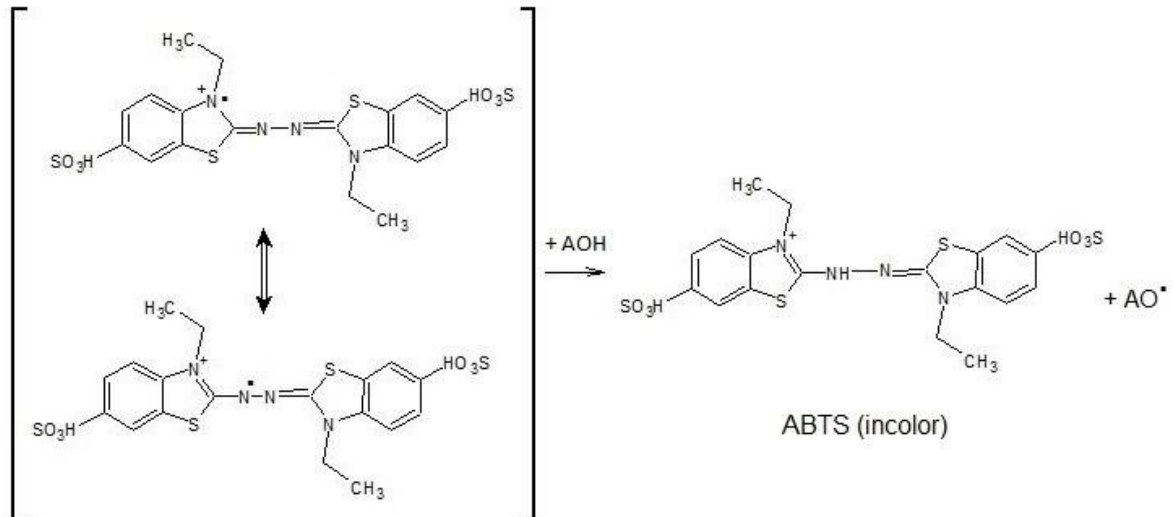
Fonte: Autoria Própria.

3.3.2 Captura do radical ABTS

Segundo Re et al. (1999), o radical de 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) é formado pela reação de redução do ABTS pelo persulfato de potássio. Este método tem a capacidade de quantificar antioxidantes capazes de inibir o radical ABTS. A coloração da solução inicialmente é verde e à medida em que reage com os antioxidantes da amostra, sofre redução (Figura 6); promovendo descoloração da solução, a qual é medida a 734 nm. A absorbância medida após a reação com a amostra é comparada com a absorbância verificada após a reação com um antioxidante sintético padrão, como por exemplo o Trolox.

O resultado é expresso em atividade antioxidante equivalente ao Trolox por grama (do inglês, TEAC g^{-1}).

Figura 6 - Reação entre o radical ABTS e um antioxidante padrão.

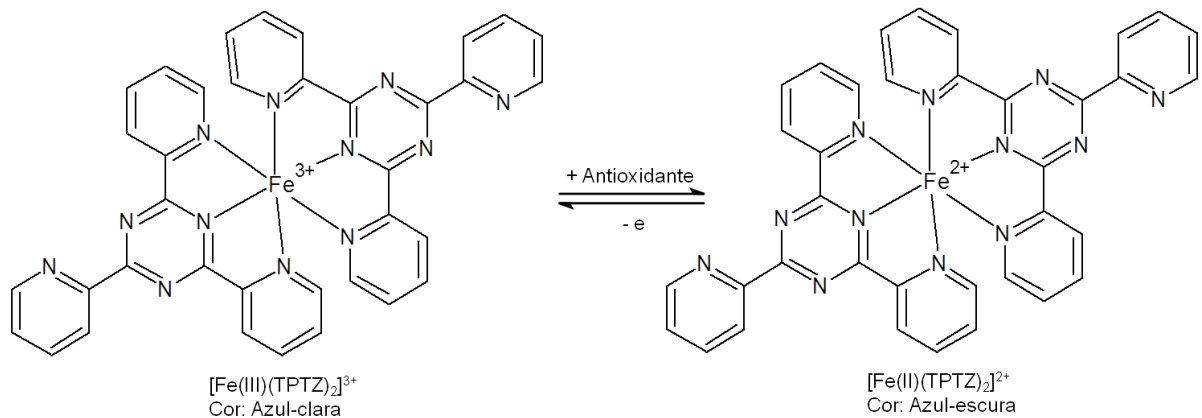


Fonte: Autoria própria.

3.3.3 Método de redução do ferro - FRAP

Este método avalia a presença de antioxidantes capazes de reduzir o complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ), a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ) (Figura 7), em pH ácido. Os valores de FRAP são obtidos pela medida da absorbância a 593 nm, quando o mesmo reage com a amostra. Este valor é comparado com a absorbância obtida pela reação ocorrida com uma solução que contém íons ferrosos em concentrações conhecidas. É um ensaio relativamente barato, de simples preparo, e os resultados são reprodutíveis, além de ser um método rápido (BENZIE; STRAIN, 1996; MARTINS et al., 2013).

Figura 7 - Redução do complexo de TPTZ Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um antioxidante genérico.



Fonte: Autoria própria.

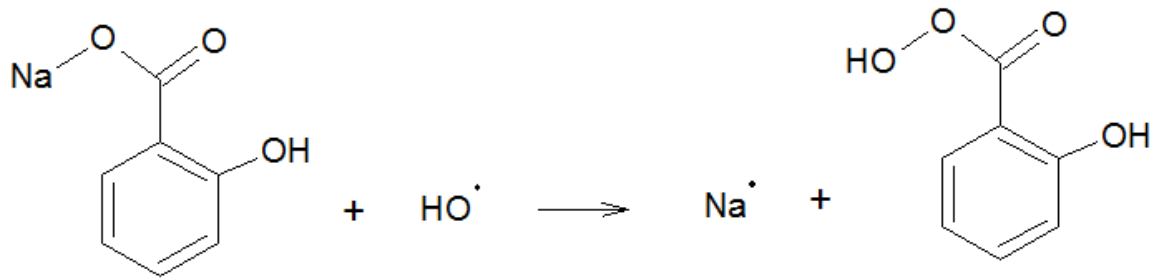
3.3.4 Atividade de sequestro de Radical Hidroxila ($HO\cdot$)

Essa metodologia mede a capacidade que uma amostra tem em sequestrar os radicais hidroxila, gerados pela reação do sulfato ferroso ($FeSO_4$), com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação de Fenton), (Equação 1). Para comparação é utilizado um antioxidante conhecido, como a vitamina C (controle positivo) e também a glicose (controle negativo) por ser um açúcar (LIU et al., 2010; ALVES et al., 2010).



Os radicais produzidos pela Reação de Fenton podem ser sequestrados por antioxidantes presentes na amostra, e os que não são sequestrados acabam participando da reação de hidroxilação do salicilato de sódio. A quantidade de salicilato-hidroxilado é medida por espectrofotometria em 562 nm. Quanto menor for a concentração de antioxidantes presentes na amostra mais salicilato-hidroxilado estará presente (LIU et al., 2010). Os resultados são expressos em porcentagem de remoção.

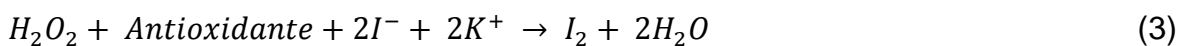
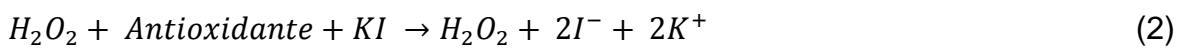
Figura 8 - Reação de hidroxilação do salicilato de sódio.



Fonte: Autoria própria.

3.3.5 Atividade de remoção de H₂O₂

A capacidade que uma amostra tem em remover o peróxido de hidrogênio, é medida utilizando o H₂O₂ misturado com a amostra a ser analisada, que vai reagir em meio ácido com iodeto de potássio liberando iodo, deixando a solução amarelada. A quantidade de iodo liberada é determinada por titulação com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio, a qual é adicionada até a solução ficar incolor (LIU et al., 2010). As reações são demonstradas nas equações 2,3 4 4.

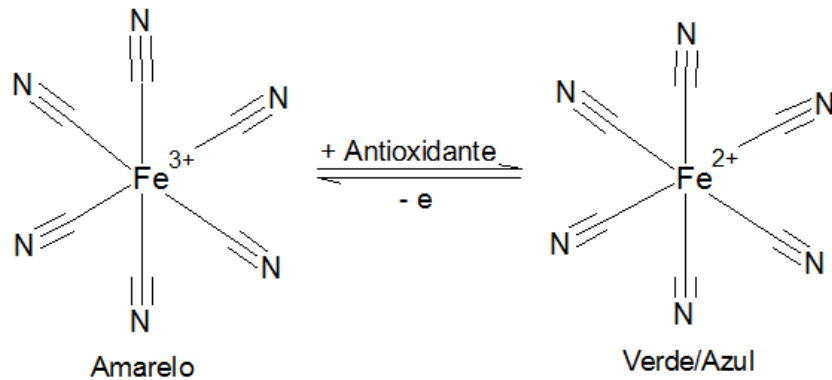


3.3.6 Poder Redutor

O poder redutor avalia o potencial da amostra em reduzir o Fe³⁺ em Fe²⁺ (Figura 9), em meio ácido. Nesta reação, ocorre uma mudança de coloração de azul para verde/azul dependendo do potencial da amostra testada, que é determinado pela medida da absorbância da amostra em 700 nm. A absorbância das amostras são comparadas com um antioxidante conhecido, como a vitamina

C (LIU et al., 2010; MORAIS, 2011).

Figura 9 - Redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} por um antioxidante.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Atividade Antimicrobiana

Uma droga antimicrobiana é uma substância química que consegue destruir microrganismos patogênicos, podendo ser microbicida ou microbiostático; os antimicrobianos microbicidas matam o microrganismo diretamente, enquanto que os microbiostáticos, apenas impedem o crescimento do microrganismo por determinado tempo (TORTORA et al., 2005).

Alguns microrganismos são capazes de resistir a essas substâncias, seja de forma natural, onde a droga não é capaz de se ligar ao microrganismos ou através da aquisição de genes por conjugação, transformação e transdução ou pelo acúmulo de mutações pontuais em genes. Dentre os mecanismos de resistência a antimicrobianos destacam-se: alteração conformacional ou bioquímica do sítio ativo alvo; alteração da permeabilidade da membrana celular; efluxo inativo e inativação enzimática do antimicrobiano (YAMADA-OGATTA et al., 2015).

O uso indiscriminado e descontrolado de antimicrobianos, resulta na resistência dos microrganismos a maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que tem levado a um aumento no número de infecções por bactérias resistentes (YAMADA-OGATTA et al., 2015; BERNABÉ et al., 2017; LOW; NG; HE, 2016;

WENCEWICZ, 2016). Por isso, é imprescindível que ocorra uma mudança de comportamento, em relação ao uso de antimicrobianos, sendo necessário avaliar os benefícios e riscos do tratamento, escolher o medicamento específico para a cepa causadora da infecção bem como estabelecer a via e a dose adequados; além de administrar o antibiótico no momento, frequência e duração correta (DAVEY et al., 2015).

Em vista disso, a pesquisa de novas drogas com potencial antimicrobiano é de extrema importância, principalmente para a indústria farmacêutica. Plantas, fungos e insetos são destacados como fontes naturais importantes para pesquisar novos antibióticos, o rastreamento dessas fontes é de suma importância para a pesquisa desses compostos (PASDARAN; HAMED, 2017).

Os polissacarídeos por sua vez, têm apresentado potencial antimicrobiano, especialmente aqueles produzidos por fungos ou provenientes de plantas. Devido as inúmeras aplicações dos polissacarídeos, a atividade antimicrobiana aliada a ele pode ser muito interessante a nível industrial, possibilitando inúmeras aplicações (CHENG; FENG; SHEN, 2013; TAHMOUZI; GHODSI, 2014; TAHMOUZI, 2014).

XIE et al. (2012) descreveram capacidade antimicrobiana de polissacarídeo extraído de folhas de *Cyclocarya paliures* frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter aerogenus*, *Proteus vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sp.*, *Aspergillus niger*, *Mucor* e *Penicillium sp.*

Desta mesma forma, o polissacarídeo extraído das folhas de *Capparis spinosa* L. também foi estudado frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Bacillus panis* e *Staphylococcus aureus*, apresentando atividade antimicrobiana perante todos os microrganismos citados (MAZAREI et al., 2017).

É importante destacar no entanto, que não foram encontrados dados na literatura sobre o potencial antimicrobiano do polissacarídeo extraído do tubérculo de *D. bulbifera*, reforçando a importância deste estudo para determinar potenciais aplicações futuras desse polissacarídeo.

4 MÉTODOS

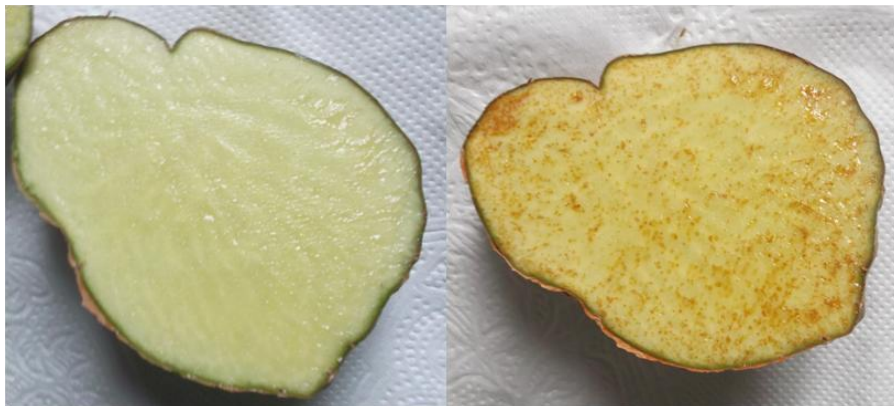
4.1 Coleta e Identificação do Material Botânico

A coleta do material botânico foi realizada no interior do município de São Lourenço do Oeste, Santa Catarina, no mês de março de 2017. A identificação do exemplar de *D. bulbifera* foi realizada pela professora Dr^a. Giovana Faneco Pereira e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, sob o número HPB 1103.

4.2 Branqueamento

O branqueamento consiste em um tratamento utilizando água fervente por um determinado tempo e temperatura, para que ocorra a inativação das enzimas responsáveis pelo escurecimento do tubérculo após remoção da casca como observado na figura 10 (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

Figura 10 - Cará-moela (esquerda) recém cortado e (direita) após 1 hora de exposição ao oxigênio.



Fonte: Autoria própria.

Antes do branqueamento, as amostras foram descascadas, lavadas e cortadas em tamanho de 1 cm². Logo após o branqueamento, a fim de comprovar a inativação das enzimas, foi realizado o teste da peroxidase, segundo metodologia sugerida por Griswold (1972), onde 5 g da amostra foram colocados em um tubo de ensaio, juntamente com 5 mL de água destilada, 1 mL da solução de guaiacol a 1% e água oxigenada a 2%. O tubo foi então agitado e deixado em repouso entre 2 e 5 minutos. Não ocorrendo mudança na coloração da amostra, considera-se que houve inativação eficiente da enzima peroxidase.

A inativação da enzima peroxidase é indicativo de que as demais enzimas presentes na amostra também foram inativadas, pois segundo Barret; Theerakulkait (1995) apud Negi; Roy (2000), esta é uma das enzimas mais estáveis ao calor e, desta forma, é utilizada como parâmetro para a determinação da eficiência em processos de branqueamento.

Foram testados três tempos; 2, 4 e 6 minutos; e verificou-se que 4 minutos em água fervente (aproximadamente 100 °C) foram suficientes para a inativação das enzimas e, desta forma, estes foram os parâmetros utilizados para o branqueamento do tubérculo no decorrer do trabalho.

4.3 Tratamento com etanol

Após o branqueamento do material, o mesmo foi submetido a tratamento com etanol (95%) por 2 horas em ultrassom, para a remoção da coloração amarelada presente no material. Após o tratamento com etanol, o material foi imerso em água para reidratação (LU; NAN; JIO, 2009).

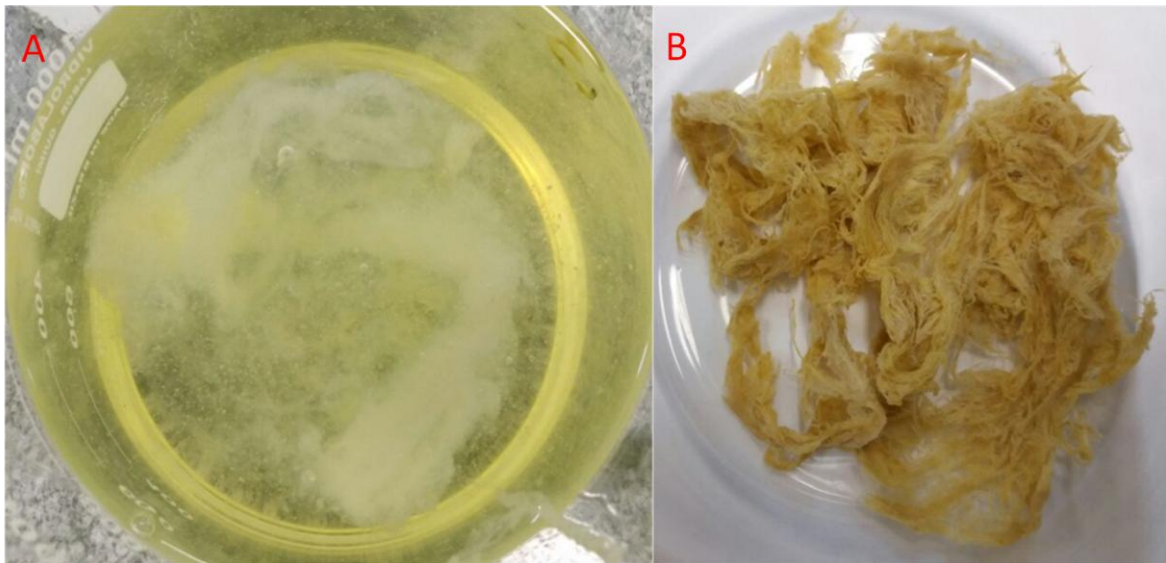
4.4 Extração do polissacarídeo do cará moela (*D. bulbifera*)

A extração do polissacarídeo presente no cará-moela foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Maity et al. (2014), com modificações.

Para a extração, foi utilizada uma mistura na proporção de 1:1 de amostra e água, encubada em ao banho-maria a 80 °C, por 1 hora, e então, a amostra foi armazenada a 4 °C por 14 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4 °C, 8000 rpm, por 50 min. e então o sobrenadante contendo o polissacarídeo foi recolhido, precipitado com etanol (95%) (Figura 11), liofilizado em liofilizador Liotopo (L1019) e armazenado, para posterior realização das análises laboratoriais.

Parte deste polissacarídeo passou por uma purificação parcial por diálise, para que fosse obtido o polissacarídeo pré-purificado (dialisado) (PD) o qual foi analisado juntamente com o polissacarídeo impuro (não dialisado) (PND).

Figura 11 - Polissacarídeo imerso em etanol (A) e polissacarídeo após precipitação com etanol (B).



Fonte: Autoria própria.

4.5 Caracterização Química

Todas as análises de caracterização química foram realizadas para ambos os polissacarídeos; polissacarídeo não dialisado (PND) e polissacarídeo dialisado (PD).

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C

A análise por Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C (RMN ^{13}C) foi realizada para comprovar que o sobrenadante extraído realmente é um polissacarídeo. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance 300 (7.1 T). As amostras foram rotacionadas a 10 kHz num rotor de zircônia, utilizando a técnica de polarização cruzada. Foram utilizados impulsos de 90° com tempo de repetição de 3 s e tempo de CP de 3 ms.

4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) identifica os grupos funcionais presentes no material estudado. A análise foi realizada na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, utilizando o método de ATR, em espectrofotômetro FTIR Spectrometer Frontier, Perkin Elmer.

4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o intuito de analisar a morfologia superficial do polissacarídeo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200 vezes Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi 3000.

4.5.4 Difratometria de Raio-X

A análise por DRX mostra se o material possui uma estrutura cristalina bem definida. A obtenção dos difratogramas de raio-X se deu em equipamento Rigaku Mini Flex 600 e foi realizada com fonte de radiação de lâmpada de cobre, corrente de 15 mA, tensão de 40 kV, velocidade de 3° min^{-1} e passo de 0,02 graus.

4.5.5 Análise Térmica

A análise térmica avalia a estabilidade térmica da amostra. As amostras foram submetidas a Análise Termogravimétrica (do inglês, Thermogravimetry Analysis - TGA), Análise Térmica Diferencial (Differential Thermal Analysis - DTA) e Termogravimetria Derivada (Derivative Thermogravimetry - DTG). A perda de massa foi acompanhada a uma taxa de aquecimento de $10^\circ \text{ C min}^{-1}$, entre 26° C e 800° C com atmosfera de ar sintético e fluxo de 50 mL min^{-1} em equipamento da TA Instruments Q 600.

4.6 Atividade Antioxidante

4.6.1 Sequestro do Radicar DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada conforme metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995) com algumas modificações. Foram adicionados 0,5 mL dos padrões ou das amostras previamente diluídas em tubos de ensaio, juntamente com 3,0 mL de etanol (50% v/v) e 0,3 mL da solução alcóolica de DPPH ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Após 45 minutos de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Para a construção da curva padrão, foi utilizado o antioxidante sintético Trolox em diferentes concentrações (15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

4.6.2 Captura do Radical ABTS

Este método é utilizado para medir a atividade antioxidante por meio da captura do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) ou radical ABTS, e foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999), com modificações. Primeiramente, o radical ABTS foi gerado a partir da reação de 7 mmol L^{-1} de ABTS com 140 mmol L^{-1} de persulfato de potássio. Tal mistura foi mantida à temperatura ambiente e ausência de luz por um período de 16 horas.

Uma solução de etanol (40% v/v) foi diluída com a solução do radical ABTS até atingir absorvância de 0,700 no comprimento de onda de 734 nm. Em seguida, utilizando tubos de ensaio, adicionou-se 30 μL das amostras já diluídas e 3 mL da solução do radical ABTS. A curva padrão foi construída utilizando o antioxidante sintético Trolox em diversas concentrações (100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

4.6.3 Poder Redutor do Íon Ferro - FRAP

A atividade antioxidante pelo método de poder antioxidante de ferro - FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), e para isso, foi utilizada a metodologia sugerida por Benzie; Strain (1996), com modificações.

O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 25 mL de solução tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6); 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mmol L^{-1} em 40 mmol L^{-1} de HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol L^{-1}) em solução aquosa.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μL da amostra devidamente diluída e 3 mL do reagente FRAP. Em seguida, os tubos foram armazenados a 37 $^{\circ}\text{C}$ em banho-maria e em ausência de luz durante 30 minutos. A curva de

calibração foi construída utilizando sulfato ferroso como padrão, em diferentes concentrações (200, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A absorvância das soluções foi medida no comprimento de onda de 595 nm.

4.6.4 Sequestro do Radical Hidroxila

A atividade de sequestro do radical hidroxila (HO) foi determinada seguindo procedimento de Liu et al. (2010) com modificações. Foi adicionado em um tubo de ensaio, 5 mL de FeSO_4 ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$), 0,35 mL de H_2O_2 (6 mmol L^{-1}), 0,15 mL de salicilato de sódio (20 mmol L^{-1}) e 1 mL do polissacarídeo já diluído. Para comparação, foi utilizado ácido ascórbico e glicose na mesma concentração da amostra. Para controle 1, colocou-se em outro tubo todos os reagentes utilizados, exceto a amostra, que foi substituída por água. Como controle 2 foi feita uma mistura contendo todos os reagentes e a amostra menos o salicilato de sódio. Após incubação por 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a absorvância do complexo salicilato-hidroxilado foi medida em espectrofotômetro a 562 nm. A porcentagem de remoção foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ de Remoção de HO} \bullet = \left[1 - \frac{(A1-A2)}{A0} \right] \times 100\% \quad (5)$$

Onde A1 representa a absorvância da amostra, ácido ascórbico ou glicose. A0 a absorvância do controle 1 e A2 a absorvância do controle 2.

4.6.5 Atividade de remoção de H_2O_2

A capacidade de remoção de H_2O_2 foi determinada de acordo com Liu et al. (2010). Foi adicionado 1 mL de H_2O_2 ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, recém preparado), 1 mL de polissacarídeo previamente diluído, 0,1 mL de molibdato de amônio (3% m/v), 10

mL de H_2SO_4 (2 mol L^{-1}), e 7 mL de KI ($1,8 \text{ mol L}^{-1}$). A mistura foi titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 mmol L^{-1}) até o desaparecimento da cor amarela. Para comparação, foi determinada a capacidade de remoção da vitamina C (controle positivo) e da glicose (controle negativo) na mesma concentração da amostra. A atividade de remoção foi calculada segundo a equação a seguir:

$$\text{Remoção H}_2\text{O}_2 = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100\% \quad (6)$$

Onde V_0 foi o volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizada para titular a mistura controle e V_1 o volume da titulação das misturas contendo amostras.

4.6.6 Poder Redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com Liu et al. (2010), neste método, foram adicionados 2,5 mL do polissacarídeo diluído a 2,5 mL de ferricianeto de potássio (1% m/v) incubado a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos e então a reação foi finalizada pela adição de 2,5 mL de solução TCA (ácido tricloroacético 10% m/v) seguido da adição de 5 mL de água deionizada e 1 mL de solução de cloreto férrico (0,1% m/v). A absorbância da solução foi mensurada a 700 nm. Para comparação foi utilizado a vitamina C (controle positivo) e a glicose (controle negativo) na mesma concentração da amostra. Quanto maior a absorbância da mistura maior o poder redutor da amostra.

4.7 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do polissacarídeo de cará-moela (*D. bulbifera*) foi investigada frente a cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos de importância clínica, alimentar e tecnológica.

Tabela 1 - Descrição dos microrganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana das amostras.

Nome	ATCC	Classificação
<i>Listeria monocytogenes</i>	19111	Bactéria
<i>Bacillus cereus</i>	10876	Bactéria
<i>Campylobacter jejuni</i>	33291	Bactéria
<i>Salmonella gallinarium</i>	9184	Bactéria
<i>Enterococcus faesium</i>	19433	Bactéria
<i>Proteus mirabilis</i>	35659	Bactéria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Bactéria
<i>Salmonela enteritidis</i>	13076	Bactéria
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Bactéria
<i>Escherichia Coli</i>	25922	Bactéria
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Bactéria
<i>Salmonella bongori</i>	43975	Bactéria
<i>Salmonella typhimurium</i>	0028	Bactéria
<i>Bacillus subtilis</i>	19659	Bactéria
<i>Candida albicans</i>	10231	Levedura
<i>Candida tropicalis</i>	13803	Levedura
<i>Aspergillus niger</i>	6275	Fungo filamentoso
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	Fungo filamentoso
<i>Penicillium chrysogenum</i>	10106	Fungo filamentoso
<i>Penicillium expansum</i>	* isolado da maçã	Fungo filamentoso

A determinação da atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco difusão, seguindo as metodologias sugeridas por Karaman et al. (2003) e Rabanal et al. (2002) e pelos protocolos padrão CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), documentos M27-A3 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), M44-A2 (Metodologia para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Disco–Difusão para Leveduras), M02-A11 (Padrões de desempenho para testes em disco de susceptibilidade antimicrobiana), M7-A6 (Metodologia do Teste de

Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico), M38-A2 (Método de Referências de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Fungos Filamentosos), com algumas modificações.

As bactérias foram cultivadas em ágar Müller Hinton, e as leveduras e fungos filamentosos em ágar Sabouraud com cloranfenicol, os quais foram preparados conforme orientação do fabricante.

As culturas microbianas foram cultivadas nos meios de cultura citados anteriormente e incubadas por 24 - 48 h, a de 35- 37 °C para bactérias e 25 - 27 °C para leveduras e fungos filamentosos, a fim de se obter culturas ativas. Após a reativação as cepas foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio, contendo água peptonada tamponada; preparada conforme a orientação do fabricante; esterilizadas, até atingirem a concentração 0,5 da escala McFarland ($\pm 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Em seguida, 100 µL da suspensão microbiana foi colocada em uma placa de petri contendo ágar, Müller Hinton para bactérias e Sabouraud com cloranfenicol para fungos, e com um swab esterilizado o inóculo foi espalhado uniformemente sobre toda placa.

Na sequência, 10 µL do material testado a uma concentração de 30 mg mL⁻¹ e esterilizado foram impregnados em discos de 5 mm, os quais foram colocados sobre o meio de cultura inoculado com o microrganismo de interesse, de forma a avaliar se o material testado teria efeito inibitório sobre o microrganismo.

Como controle positivo, foram utilizados os antimicrobianos padrões norfloxacina e tetraciclina (bactéria); fluconazol e natamicina (leveduras e fungos filamentosos), todos a uma concentração de 1 mg mL⁻¹. Como controle negativo foi utilizado água peptonada.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica por 24-48 h, a temperatura de 35-37 °C para bactérias e 48-72 h, a temperatura de 25-27 °C para leveduras e fungos filamentosos. Após este período, foi realizada a medição da circunferência dos halos de inibição com paquímetro e os resultados expressos em mm (OSTROSKY et al., 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração

A Figura 10 apresenta o aspecto visual das amostras de polissacarídeo extraído do tubérculo de cará-moela PND (A) e PD (B), ambos com a mesma massa (1 g), é possível observar que o PD tem aspecto de algodão e tem uma densidade muito menor ao PND. Além disso pode-se verificar que toda a coloração existente na amostra PND foi eliminada com a dialise, o que mostra que a dialise realmente pré-purificou o polissacarídeo.

Figura 12 - PND (A) e PD (B), ambos após liofilização.



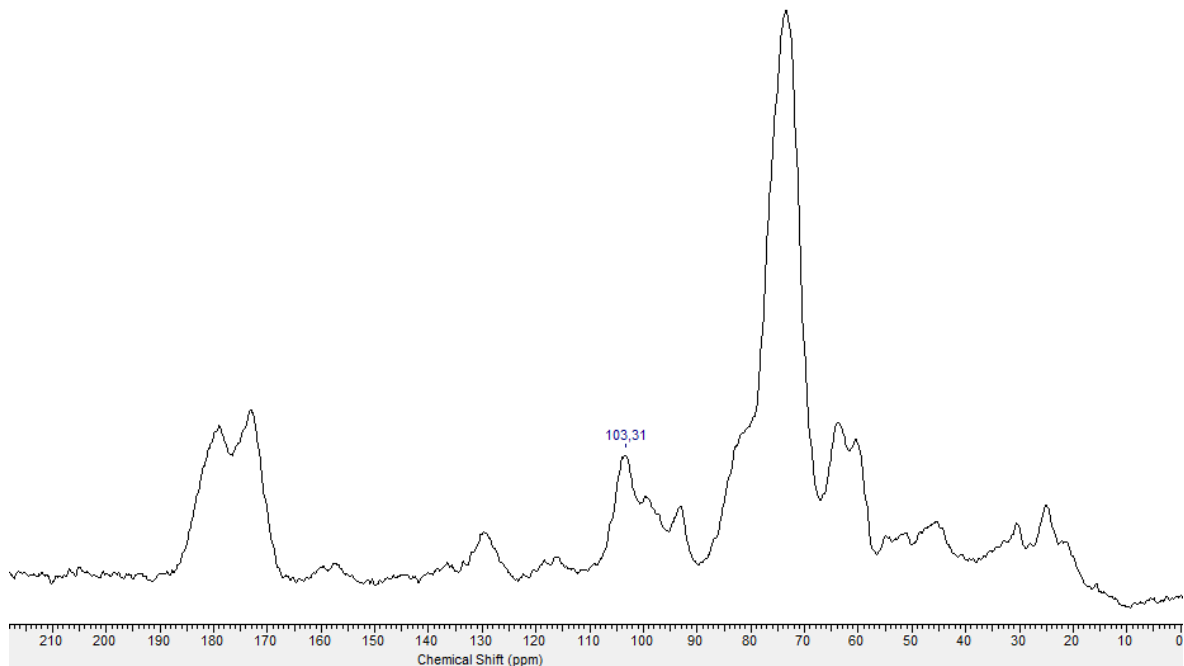
Fonte: Autoria Própria.

5.1 Caracterização Química

5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C

Uma amostra do polissacarídeo não dialisado, (PND) foi submetida à análise por RMN ^{13}C (sólido), sendo que, a absorção mais importante a ser observada é aquela que indica a presença de polissacarídeos na amostra. Dados da literatura atribuem absorções em 101 a 106 ppm à átomos de carbonos anoméricos de manopirranose e glicopirranose, respectivamente (Zhao et al., 2005). Na amostra analisada, o carbono com absorção em 103,31 ppm está sendo considerado como anomérico, o que indica tratar-se de um polissacarídeo, (Figura 13).

Figura 13 - RMN ^{13}C da amostra PND.



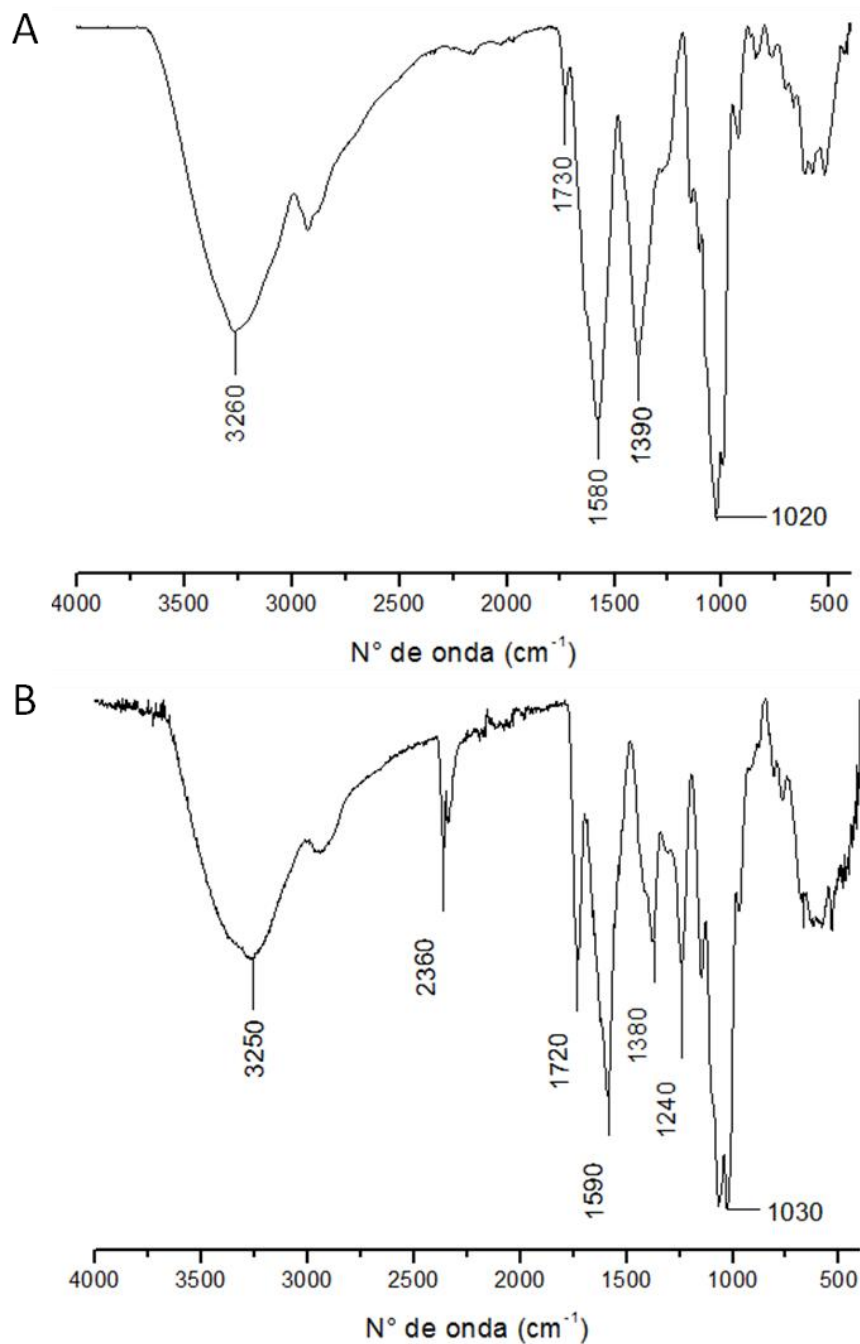
Fonte: Autoria própria.

Zhao et al. (2005) avaliou o polissacarídeo encontrado na *Dioscorea opposita*, onde comprovou a presença de polissacarídeos na composição da amostra, em função do sinal de carbono anomérico verificado em 102,5 ppm.

5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

O PD e o PND foram avaliados pela técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, os resultados obtidos estão descritos na figura 14.

Figura 14 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier do (A) PND e (B) PD extraído do tubérculo de cará-moela.



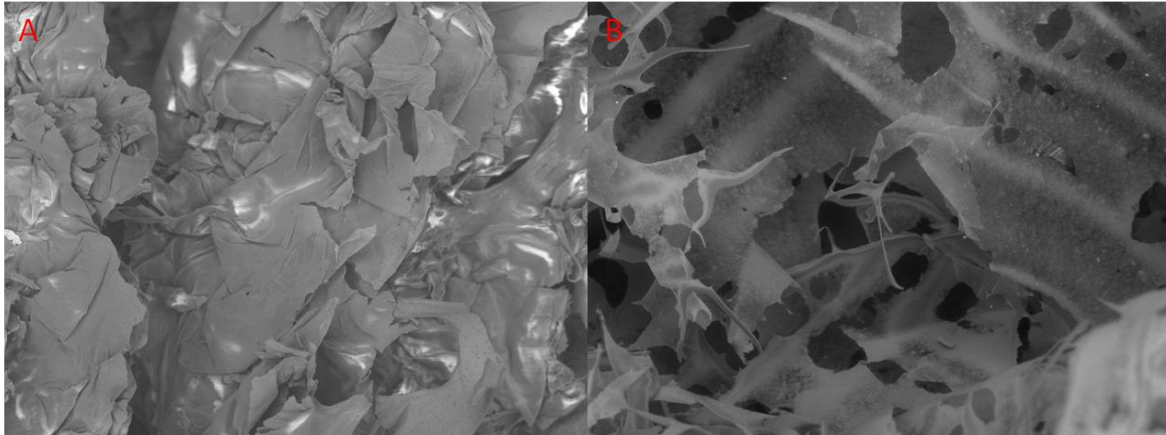
Fonte: Autoria própria.

Os espectros de IV-TF das amostras PD (Figura 14A) e PND (Figura 14B) são semelhantes entre si, mas algumas bandas de absorção diferentes, merecem ser destacadas. Em ambos os espectros há uma banda atribuída à presença de OH em 3260 cm^{-1} e 3250 cm^{-1} , respectivamente, bandas essas consideradas características de polissacarídeos (JAHANBIN et al., 2017; LIU et al., 2017; MENG et al., 2017; RASHID et al., 2018; REN et al., 2017; SOUZA et al., 2015). A banda existente em 2938 cm^{-1} corresponde a vibração de alongamento de C-H, especialmente do metil (LIU et al., 2017; MENG et al., 2017; RASHID et al., 2018; REN et al., 2017; SILVA-LEITE et al., 2017). No espectro do PD podemos observar uma banda na região de 2300 cm^{-1} , absorção característica de CO_2 , que aparece muitas vezes devido a saturação de CO_2 presente no ambiente da análise (SILVERSTEIN et al., 2006). Em 1020 cm^{-1} (A) e em 1030 cm^{-1} (B), observa-se uma banda característica de carboidratos que pode indicar a presença de piranose (LIU et al., 2017; MENG et al., 2017; REN et al., 2017; SILVA-LEITE et al., 2017). É importante ressaltar que essa banda está bem mais definida na amostra PD, o que pode ser associado a retirada de impurezas e pré-purificação ao qual a amostra foi submetida. Outra diferença importante encontra-se na região de 1750 cm^{-1} , característica de compostos que apresentam carbonila, quase inexistente na amostra PND e bem definido na amostra PD. Já as absorções entre de $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$, observadas em ambos os espectros, são características de carboidratos (SOUZA et al., 2015).

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras do PSD e PD foram analisadas por MEV e as micrografias são apresentadas na figura 15.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura do (A) PND e (B) PD, ampliação de 200 vezes.



Fonte: Autoria própria.

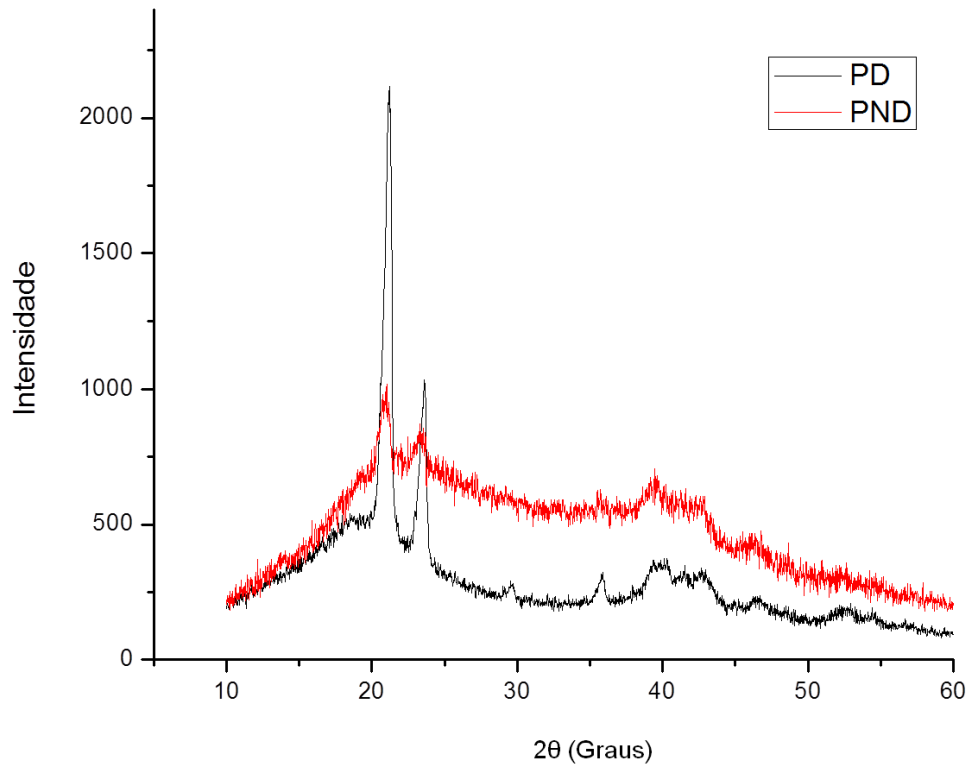
Através das imagens obtidas por MEV (Figura 15) é possível observar que tanto o PND (Figura 15A) quanto o PD (Figura 15B) têm morfologias bem semelhantes, ambos possuem a característica de formar películas ou "folhas" sem formato definido e mensurável. A diferença é que o PND apresenta-se de forma mais compactada, com as "folhas" mais juntas e densas. Estudos com outros polissacarídeos detectaram morfologia muito semelhante aos encontrados neste trabalho; Pan et al. (2017) trabalhou com um heteropolissacarídeo da seda do milho, a micrografia do mesmo foi muito semelhante ao PD e ele associou os poros presentes na amostra ao processo de liofilização; Yu et al. (2017) estudou o polissacarídeo presente no *ginseng* americano e o mesmo apresentou estrutura semelhante à folhas secas e estruturas laminadas como as observadas para o PD e PND no presente estudo. Zhao et al. (2017) analisou o polissacarídeo existente na *Dioscorea hemsleyi*, o qual também se mostrou em forma de folha muito semelhante as morfologias do PND e PD.

5.1.4 Difractometria de Raio-X

Os difratogramas de Raio-X das amostras PD e PND estão apresentados

na figura 16.

Figura 16 - Difratoograma de Raio-X do PND e PD.



Fonte: Autoria própria.

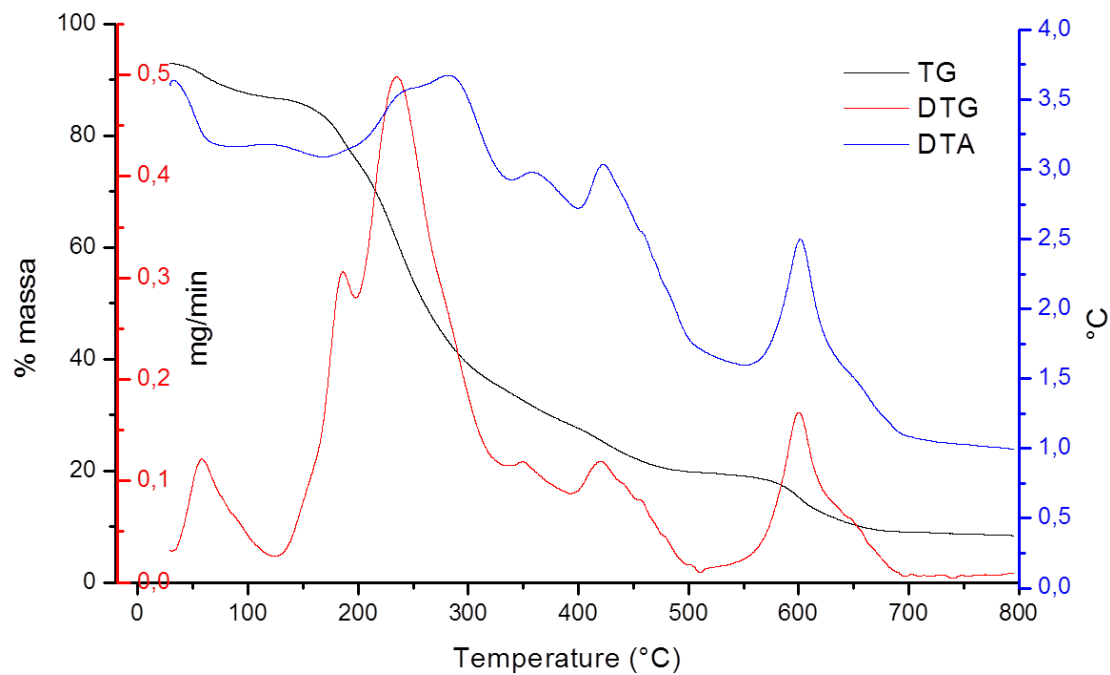
Para avaliar a cristalinidade das amostras de polissacarídeo PD e PND foi utilizado o DR-X, e os resultados estão apresentados na Figura 16. Os difratogramas das amostras PND e PD indicam picos de cristalinidade em $21,54^\circ$ e $23,62^\circ$ 2θ (Graus) em ambas as amostras. Porém, a maior parte do material é amorfo o que é algo muito comum em amostras desta natureza. Este perfil também foi observado em diversos estudos com diferentes tipos de polissacarídeos (BALLESTEROS et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Observa-se ainda, que a amostra PD (Figura 17) apresentou picos mais intensos e definidos, o que indica que a purificação parcial da amostra deixou a mesma com maior cristalinidade. Na literatura, existem alguns trabalhos sobre o amido, que também é um polissacarídeo, obtido de diferentes espécies de *Dioscorea*, inclusive da

própria *Dioscorea bulbifera*, porém, os difratogramas desses amidos são completamente diferentes quando comparados com os difratogramas de PD e PND, o que torna possível afirmar que PD e PND não são amostras compostas por amido (HORNUNG et al., 2017).

5.1.5 Análise Térmica

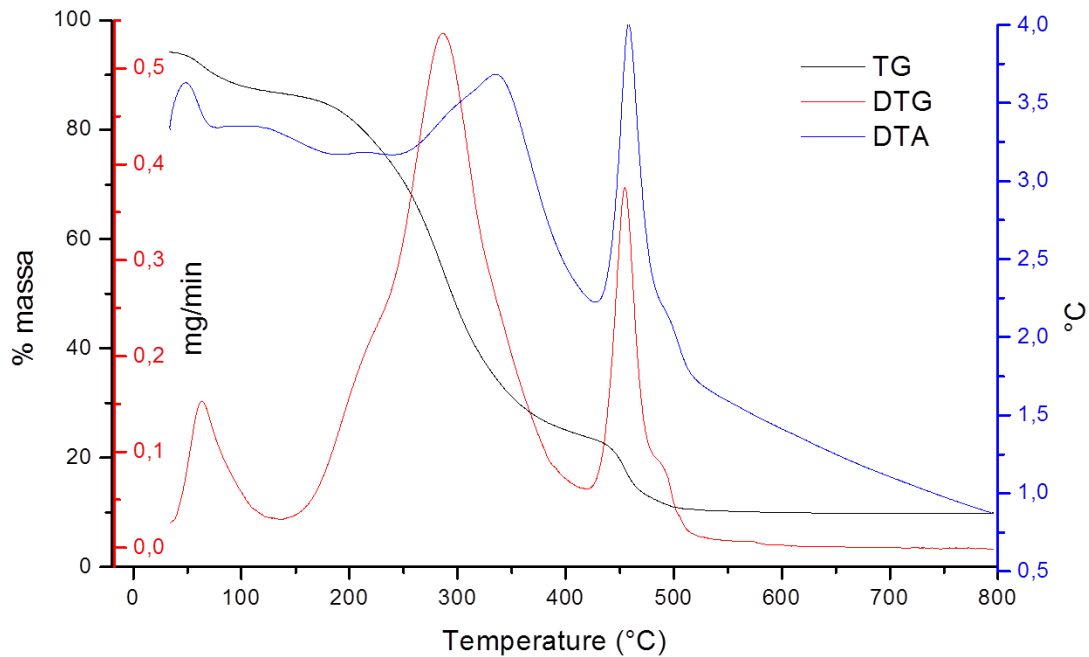
Nas Figuras 17 e 18 é possível observar as curvas de TG, DTG e DTA das amostras de polissacarídeo PD e PND respectivamente, onde é perceptível que as amostras apresentam diferenças em suas curvas de termogravimetria.

Figura 17 - Curvas TGA, DTA e DTG do PND.



Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Curvas TGA, DTA e DTG do PD.



Fonte: Autoria própria.

Através da curva TG da amostra PND é possível verificar uma perda de massa antes dos 100 °C, confirmada pelo pico da DTG em 57,98 °C, a qual pode ser associada à desidratação da amostra, o que pode ser confirmado pelo leve decréscimo no início da DTA e que caracteriza uma reação endotérmica. Uma segunda perda de massa é verificada de 150 a 500 °C, porém, quando a DTG é analisada pode-se constatar que essa etapa na verdade, se desdobra em várias outras etapas. Na DTG há dois picos que se sobrepõem na região de 150 à 300 °C. Além disso, na região de 310 a 550 °C há vários picos de decomposição, o que indica que uma grande perda de massa ocorre em diversas etapas. De 550 a 700°C verificar-se pela TG que ocorre mais uma perda de massa pela amostra e o pico bem definido observado em aproximadamente 677,9 °C na DTG comprova que essa reação ocorre em apenas uma etapa. Através da DTA podemos verificar um pico exotérmico bem definido em 688,72 °C, porém, durante todo o processo é possível observar outros picos exotérmicos não tão definidos. Diante disso pode-se dizer que a amostra PND não é muito estável termicamente e tem vários estágios de decomposição vindo a estabilizar-se próximo à temperatura de 700 °C. Pode-se afirmar também que a quantidade de matéria orgânica da amostra

PND chega a 84% e o resíduo da análise térmica é constituído por compostos inorgânicos presentes na amostra.

Na Figura 18, observar-se pela curva de TG que a amostra PD possui três estágios de perda de massa, que acontecem em uma única etapa, e que podem ser vistos tanto na TG quanto na DTG. A primeira reação de decomposição observada na TG se dá antes da temperatura em 150 °C e é confirmada pelo pico da DTG em 63,23 °C, que pode ser vinculada à desidratação da amostra. A segunda perda de massa observada pela TG se dá entre 175 e 400 °C e é confirmada pelo pico bem definido da DTG em 286,34 °C, sendo essa etapa a mais significativa do processo. Por fim, a última perda de massa verificada acontece no intervalo de 425 a 600 °C na TG, e o pico da DTG em 454,73 °C corresponde a essa decomposição. Através da DTA verificar-se dois picos exotérmicos durante a análise, eles ocorrem muito próximos ou na mesma temperatura que os picos da DTG. Desta forma, pode-se afirmar que a decomposição da amostra PD ocorre em três etapas bem definidas, o que pode ser associado a diálise da amostra, pois muitas impurezas foram eliminadas nesta etapa. A decomposição estabiliza próximo à temperatura de 600 °C, temperatura essa, inferior a de estabilização da amostra PND. Isso pode ser devido a menor quantidade de matéria orgânica presente na amostra, em função de ter sido submetida ao processo de diálise, além da facilidade na degradação da matéria orgânica presente na amostra em comparação com a anterior. Foi possível determinar pela análise da TG que a quantidade de matéria orgânica presente na amostra chega a 80%, valor não muito inferior ao encontrado para a amostra PND.

5.2 Atividade Antioxidante

5.2.1 DPPH, ABTS e FRAP

Na Tabela 2 podemos observar os resultados obtidos na análise da atividade antioxidante, pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP, para as duas amostras, PD e PND.

Tabela 2 - Resultados obtidos para a atividade antioxidante, pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP das amostras PD e PND.

Método	PD	PND
DPPH (mg eq. Trolox g ⁻¹)	0,28 ± 0,01	0,94 ± 0,02
ABTS (mg eq. Trolox g ⁻¹)	623,33 ± 4,71	165,00 ± 2,36
FRAP (mmol Fe ²⁺ g ⁻¹)	0,175 ± 0,001	1,056 ± 0,001

Fonte: Autoria própria.

Através das três metodologias realizadas para determinar a atividade antioxidante foi possível verificar que PND é a amostra que apresenta maior atividade antioxidante para duas metodologias, DPPH e FRAP, enquanto que a amostra PD só se destacou em uma das metodologias, ABTS.

Devido a isso, podemos afirmar que, para DPPH e FRAP a atividade antioxidante determinada nas amostras está intimamente ligada as impurezas presentes, pois quando o polissacarídeo foi pré-purificado a atividade antioxidante diminuiu consideravelmente, principalmente em FRAP.

A amostra PD apresentou maior capacidade antioxidante na metodologia de ABTS, e isso mostra que o polissacarídeo pré-purificado teve maior capacidade de captura do radical ABTS e que neste caso, as impurezas diminuíram a atividade antioxidante quantificada por esse método (Tabela 2).

Oligossacarídeos extraídos da casca do amendoim apresentaram atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS. Os valores variaram de 9,6 a 11,8 mg eq. Trolox g⁻¹ para DPPH, o que comparado aos valores encontrados para o polissacarídeo extraído do tubérculo do cará-moela mostra-se superior. Para ABTS os valores ficaram entre 34,6 e 53,0 mg eq. Trolox g⁻¹, o que neste caso são valores muito inferiores aos determinados para o polissacarídeo extraído do cará-moela (Tabela 2), o que indica que as amostras PND e PD tem uma maior capacidade de captura do radical ABTS quando comparadas com os oligossacarídeos da casca do amendoim (RICO et al., 2018).

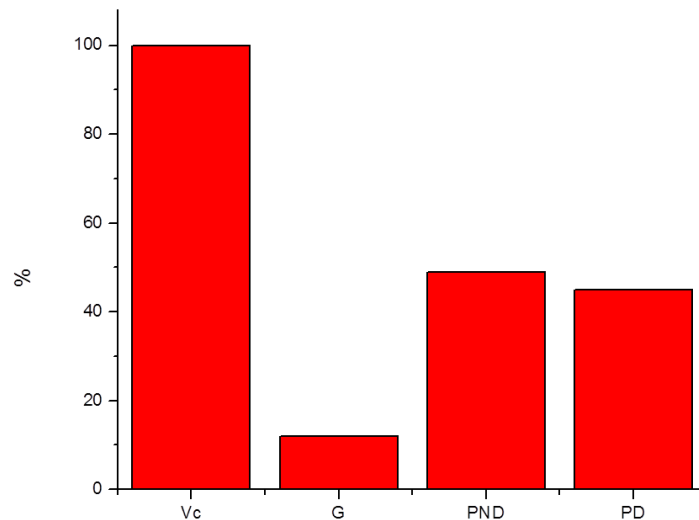
A análise de polissacarídeos presente em diferentes variedades da raiz tuberosa de lótus detectou atividade antioxidante dos mesmos por FRAP, os resultados variaram de 0,10 a 1,85 mmol de $\text{Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, tais valores são semelhantes aos encontrados para o polissacarídeo da *D. bulbifera* estudado neste trabalho, algo que pode ser esperado devido a similaridade das fontes de polissacarídeo estudado (YI et al., 2017).

Polissacarídeos geralmente apresentam atividade antioxidante menor do que as presentes em outros materiais como, por exemplo extratos de plantas, mas mesmo assim são resultados relevantes e muito interessantes principalmente quando se pensa em aplicação desses polissacarídeos, pois eles podem agregar essa propriedade ao produto final. Porém, neste caso, analisando os resultados obtidos seria mais interessante a utilização do PND pois, o mesmo apresenta melhor atividade antioxidante em dois dos testes realizados.

5.2.2 Remoção do radical OH

Na Figura 19 são apresentados os resultados obtidos na análise de remoção do radical hidroxil pelas amostras PND e PD em comparação com amostras de glicose e vitamina C.

Figura 19 -Remoção do radical hidroxila pelas amostras PND, PD, vitamina C (Vc) e Glicose (G).



Fonte: Autoria própria.

Pode-se perceber que a vitamina C consegue remover praticamente 100%, do radical hidroxil presente, pois a mesma é controle positivo, enquanto que a glicose remove em torno de 10% apenas sendo o controle negativo.

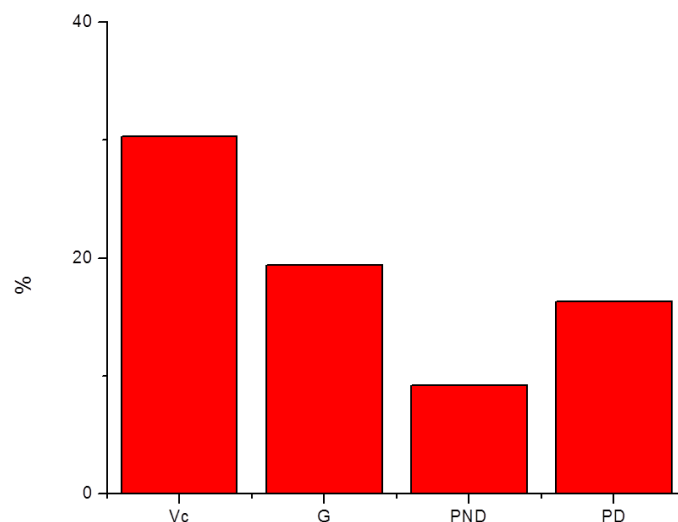
Através da Figura 19 observa-se que as amostras PND e PD apresentaram remoção de 49% e 45%, respectivamente, ou seja, removem quase metade do radical hidroxila o que pensando em uma aplicação é um resultado muito satisfatório pois, o radical hidroxila quando presente no corpo humano tem acesso livre às membranas celulares e podem causar danos aos tecidos. Pode-se verificar ainda, que as impurezas presentes na amostra interferem pouco na remoção do radical hidroxila.

Um estudo com polissacarídeo extraído da *Sophorae tonkinensis* Radix demonstrou capacidade de remover até 74 % do radical hidroxila (CAI et al., 2018). Dessa mesma forma, polissacarídeos presentes na *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram remoção de 93 % (CHEN et al., 2018), e o polissacarídeo da *Chuanminshen violoceanum* teve capacidade de remoção de 71%; valores superiores aos encontrados no presente trabalho (FAN et al., 2017), mas mesmo assim o polissacarídeo possui uma capacidade de remoção muito interessante chegando próximo aos 50% no caso do PND.

5.2.3 Remoção de H₂O₂

Apesar do peróxido de hidrogênio não ser muito reativo, ele induz ao envelhecimento celular e pode atacar as células devido a alta penetrabilidade das membranas celulares, por isso, é importante sua remoção (GIESE et al., 2015). A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para as amostras PND e PD para a remoção de H₂O₂, bem dos controles negativos (glicose) e controle positivo (vitamina C)

Figura 20 - Remoção de H₂O₂ pelas amostras PND e PD e dos controles positivos e negativos, Vitamina C (Vc) e Glicose (G).



Fonte: Autoria própria.

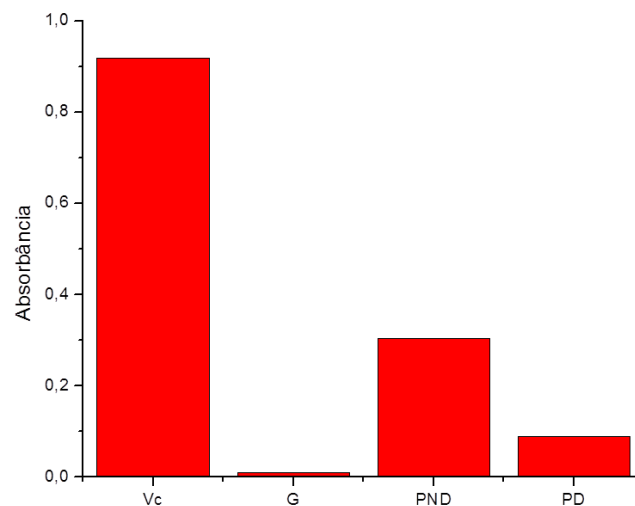
Através da Figura 20 pode-se observar que as amostras PND e PD apresentaram capacidade de remoção do H₂O₂ de 9% e 16%, respectivamente. Os valores obtidos para as amostras PND e PD são muito interessantes quando comparados com o padrão positivo, vitamina C, que apresentou remoção de apenas 30% do H₂O₂, mesmo sendo um antioxidante padrão muito utilizado. Além disso, é importante salientar que a remoção do H₂O₂ é maior no PD o que mostra que as impurezas presentes na amostra PND não apresentam esse tipo de atividade antioxidante.

Estudos com a laminarina apresentaram poder de remoção de 19% do H_2O_2 , valor muito próximo ao encontrado na amostra PND (Figura 20) (GIESE et al., 2015).

5.2.4 Poder redutor

A Figura 21 apresenta os resultados da determinação do poder redutor das amostras PND e PD.

Figura 21 - Poder redutor das amostras PND, PD, Vitamina C (Vc) e Glicose (G).



Fonte: Autoria própria.

O poder redutor das amostras é verificado de acordo com a absorbância final, quando maior a absorbância maior será o poder redutor da mesmas. Na Figura 21 observa-se que o poder redutor da amostra PND foi de 0,30, enquanto que da amostra PD foi de 0,089. Pode-se afirmar que o poder redutor das amostras está ligado as impurezas, pois o polissacarídeo dialisado apresentou poder redutor menor ao PND.

Um estudo com o polissacarídeo presente na cevada avaliou sua atividade antioxidante pela metodologia de poder redutor e obteve valores de absorbância que variaram de 0,09 a 0,28, valores esses que são próximos aos encontrados no

presente trabalho (AHMAD et al., 2016).

5.3 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras PND e PD a uma concentração de 30 mg mL⁻¹ foi testada pelo método de disco difusão frente as bactérias *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. jejuni*, *S. gallinarium*, *E. faecium*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. bongori*, *S. typhimurium* e *B. subtilis*; as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*; e fungos filamentosos *A. niger*, *A. brasiliensis*, *P. chrysogenum* e *P. expansum*. Porém na concentração testada nenhuma das amostras apresentou inibição do crescimento dos microrganismos testados. Em anexo estão apresentadas as imagens dos resultados obtidos nesta análise.

6 CONCLUSÕES

O polissacarídeo presente na *D. bulbifera* pode ser extraído em meio aquoso, e a diálise do mesmo foi realizada com sucesso para retirada de algumas impurezas presentes.

Através do RMN foi possível comprovar que PND realmente é constituída por polissacarídeo, devido a banda do carbono anomérico em 103,31 ppm.

O IV-TF também corroborou que a amostra se tratava de polissacarídeo devido, principalmente, pela intensa e característica banda de OH presente.

A análise por MEV demonstrou a morfologia das amostras e indicou que a mesma se apresenta em películas ou "folhas" sem formato mensurável, o que é muito comum em amostras de polissacarídeos.

O DRX, por sua vez, confirmou que a maior parte do material é amorfo, com picos de cristalinidade em aproximadamente 21,5° e 23,62° 2 θ .

Por meio da análise térmica foi possível verificar os estágios de decomposição da amostra, sendo que PND apresenta três estágios de decomposição, mas um deles acontece em várias etapas; o PD também apresentou três estágios de decomposição e todos acontecem em etapa única.

As amostras PND e PD apresentaram interessante atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS, FRAP, remoção do radical OH, remoção de H₂O₂ e poder redutor, além disso os resultados destas amostras ficaram bem próxima da atividade antioxidante de polissacarídeos de diferentes matérias primas.

Através dos testes por disco difusão verificou-se que as amostras não apresentam atividade antimicrobiana frente aos 20 microrganismos testados.

Os resultados obtidos neste trabalho são de fundamental importância, pois até então o polissacarídeo do cará-moela não tinha trabalhos neste sentido, e os mesmos servirão de base para futuros trabalhos.

REFERÊNCIAS

ABBASI, A. M.; KHAN, M. A.; KHAN, N.; SHAH, M. H. Ethnobotanical survey of medicinally important wild edible fruits species used by tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 528–536, 2013. Elsevier.

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

AHMAD, M.; GANI, A.; SHAH, A.; GANI, A.; MASOODI, F. A. Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare* L) changes the structural and physicochemical properties of β -D-glucan and enhances its antioxidant potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 696–702, 2016.

AHMED, Z.; CHISHTI, M. Z.; JOHRI, R. K.; et al. Antihyperglycemic and antidyslipidemic activity of aqueous extract of *Dioscorea bulbifera* tubers. **Diabetologia Croatica**, v. 38, n. 3, p. 63–72, 2009.

ALENISAN, M. A.; ALQATTAN, H. H.; TOLBAH, L. S.; SHORI, A. B. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, v. 24, p. 101–106, 2017.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Extraction of

polysaccharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, 2016.

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

BERNABÉ, K. J.; LANGENDORF, C.; FORD, N.; RONAT, J.-B.; MURPHY, R. A. Antibiotic resistance in West Africa: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 629–639, 2017.

BIESKI, I. G. C.; LEONTI, M.; ARNASON, J. T.; et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383–423, 2015.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. DE. **Antioxidantes - Princípios e Métodos Analíticos**. 1^o ed. Curitiba: Appris, 2015.

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

BRASIL. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. 2010.

CAI, L.; ZOU, S.; LIANG, D.; LUAN, L. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Sophorae tonkinensis* Radix. **Carbohydrate Polymers**, 2018.

CHEN, Y.; LIU, X.; WU, L.; et al. Physicochemical characterization of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* and its anti-ageing effects in *Drosophila melanogaster*. **Carbohydrate Polymers**, v. 185, n. 15, p. 120–126, 2018.

CHENG, H.; FENG, S.; SHEN, S.; et al. Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 101–108, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard—Second Edition—Document M38-A2. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. Document M7-A6. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. Document M02-A11. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Guideline - Second Edition - Document M44-A2. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition - Document M27-A3. 2008.

CO, E.; KOLAWOLE, S.; AWA, E. Phytochemical composition and antifungal actions of aqueous and ethanolic extracts of the peels of two yam varieties. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 2–5, 2012.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; SANT'ANA, H. M. P. Efeitos do processamento industrial de alimentos na estabilidade de vitaminas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 83–95, 2008.

CUI, H.; LI, T.; WANG, L.; SU, Y.; XIAN, C. J. *Dioscorea bulbifera* polysaccharide

and cyclophosphamide combination enhances anti-cervical cancer effect and attenuates immunosuppression and oxidative stress in mice. **Scientific reports**, v. 5, n. January, p. 19185, 2016.

CUI, H. X. Antitumor Activity and Possible Mechanism of Crude Polysaccharides from *Discorea bulbifera* L. on the Mice Bearing U14 Cervical Carcinoma. **Advanced Materials Research**, v. 560-561, p. 374–379, 2012.

DA CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos Da Biodiversidade Brasileira: Uma Oportunidade De Transformar Conhecimento Em Valor Econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649–660, 2009.

DAVEY, P.; PEDEN, C.; CHARANI, E.; MARWICK, C.; MICHIE, S. Time for action - Improving the design and reporting of behaviour change interventions for antimicrobial stewardship in hospitals: Early findings from a systematic review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 3, p. 203–212, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2002.

FAN, J.; FENG, H.; YU, Y.; et al. Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, 2017.

FELIPE, L. DE O.; JÚNIOR, W. F. DA S.; ARAÚJO, K. C. DE; FABRINO, D. L. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia* —natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–8, 2017.

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125–130, 2015.

GRISWOLD, R.M. Estudo Experimental dos Alimentos. São Paulo : Ed. Edgard Blucher, 1972.

HEINZMANN, B. M.; DE BARROS, F.M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

HORNUNG, P. S.; ÁVILA, S.; LAZZAROTTO, M.; et al. Enhancement of the functional properties of Dioscoreaceas native starches: Mixture as a green modification process. **Thermochimica Acta**, v. 649, p. 31–40, 2017.

JAHANBIN, K.; ABBASIAN, A.; AHANG, M. Isolation, purification and structural characterization of a new water-soluble polysaccharide from *Eremurus stenophyllus* (boiss. & buhse) baker roots. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 386–393, 2017.

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

KOSE, L. S.; MOTEETEE, A.; VUUREN, S. VAN. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Maseru district of Lesotho. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, p. 184–200, 2015

LE COSTAOUËC, T.; UNAMUNZAGA, C.; MANTECON, L.; HELBERT, W. New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Algal Research**, v. 26, n. February, p. 172–179, 2017.

LIU, D.; SUN, Q.; XU, J.; et al. Purification, characterization, and bioactivities of a polysaccharide from mycelial fermentation of *Bjerkandera fumosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 115–122, 2017.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 235, p. 31–61, 2015.

LIU, W.; WANG, H.; PANG, X.; YAO, W.; GAO, X. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 451–457, 2010.

LOW, A.; NG, C.; HE, J. Identification of antibiotic resistant bacteria community and a GeoChip based study of resistome in urban watersheds. **Water Research**, 2016. Elsevier Ltd.

MAITY, P.; SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; et al. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble β -d-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 140–149, 2014.

MALIK, Z. A.; BHAT, J. A.; BALLABHA, R.; BUSSMANN, R. W.; BHATT, A. B. Ethnomedicinal plants traditionally used in health care practices by inhabitants of Western Himalaya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 133–144, 2015.

MARTINS, A. C.; BUKMAN, L.; VARGAS, A. M. M.; et al. The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 574–580, 2013.

MAZAREI, F.; JOOYANDEH, H.; NOSHAD, M.; HOJJATI, M. Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 224–231, 2017.

MENG, M.; CHENG, D.; HAN, L.; CHEN, Y.; WANG, C. Isolation, purification,

structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1134–1143, 2017.

MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, v. 424, p. 30–41, 2016.

MORAIS, A. L. F. Propriedades antioxidantes de bebidas e “chás” preparados a partir de diferentes formulações. , 2011. Porto: Universidade de Porto.

NEGI, P. .; ROY, S. . Effect of blanching and drying methods on β -Carotene, ascorbic acid and chlorophyll retention of leafy vegetables. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 295–298, 2000.

OGBUAGU, M. N. Nutritive and anti-nutritive composition of the wild (In-Edible) species of *Dioscorea bulbifera* (Potato Yam) and *Dioscorea dumentorum* (Bitter Yam). **The Pacific Journal of Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 224–226, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PAN, Y.; WANG, C.; CHEN, Z.; et al. Physicochemical properties and antidiabetic effects of a polysaccharide from corn silk in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 370–378, 2017.

PASDARAN, A.; HAMED, A. Natural products as source of new antimicrobial compounds for skin infections. **The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections**. p.223–253, 2017.

RABANAL, R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 287–292, 2002.

RASHID, F.; HUSSAIN, S.; AHMED, Z. Extraction purification and characterization of galactomannan from fenugreek for industrial utilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 88–95, 2018.

RAZA, A.; LI, F.; XU, X.; TANG, J. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 335–344, 2016.

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

REN, Y. YUAN; ZHU, Z. Y.; SUN, H. QING; CHEN, L. J. Structural characterization and inhibition on α -glucosidase activity of acidic polysaccharide from *Annona squamosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1–12, 2017.

RICO, X.; GULLÓN, B.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C.; YÁÑEZ, R. Valorization of peanut shells: Manufacture of bioactive oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 21–28, 2018.

SHAJEELA, P. S.; TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Fatty acid composition of wild yam. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 16, p. 35–38, 2013.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 37–48, 2016.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as

antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6 Suppl, p. 1315S–1321S, 1995.

SILVA-LEITE, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; MENDONÇA, L. F.; et al. Polysaccharide rich fractions from barks of *Ximenia americana* inhibit peripheral inflammatory nociception in mice antinociceptive effect of *Ximenia americana* polysaccharide rich fractions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 3, p. 339–345, 2017.

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

SIMÕES, C. M. DE O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2010.

SOUZA, R. O. S.; ASSREUY, A. M. S.; MADEIRA, J. C.; et al. Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 208–215, 2015.

TAHMOUZI, S. Optimization of polysaccharides from *Zagros oak* leaf using RSM: Antioxidant and antimicrobial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 238–246, 2014.

TAHMOUZI, S.; GHODSI, M. Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 396–403, 2014.

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

WANG, J. M.; JI, L. L.; BANFORD-WHITE, C. J.; et al. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 388–394, 2012.

WANG, P. C.; ZHAO, S.; YANG, B. Y.; WANG, Q. H.; KUANG, H. X. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 86–97, 2016.

WEI, W.-C.; WANG, J.-H.; ARAVINDARAM, K.; et al. Polysaccharides from dioscorea (shān yào) and other phytochemicals enhance antitumor effects induced by DNA vaccine against melanoma. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 4, n. 1, p. 42–8, 2014.

WENCEWICZ, T. A. New antibiotics from Nature's chemical inventory. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2016.

XIE, J. et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 177-184, 2012.

XIE, J.-H.; TANG, W.; JIN, M.-L.; LI, J.-E.; XIE, M.-Y. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago spp.*, and *Morus spp.*: Structures and functionalities. **Food Hydrocolloids**, v. 60, n. 235, p. 148–160, 2016.

YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL / Departamento de Microbiologia, 2015.

YANG, F.; LIANG, Y.; XU, L.; et al. Exploration in the cascade working mechanisms of liver injury induced by total saponins extracted from *Rhizoma Dioscorea bulbifera*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1048–1056, 2016.

YI, Y.; LAMIKANRA, O.; SUN, J.; et al. Activity diversity structure-activity relationship of polysaccharides from lotus root varieties. **Carbohydrate Polymers**,

2017.

YU, X. H.; LIU, Y.; WU, X. L.; et al. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from *American ginseng*. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 9–18, 2017.

ZENG, B.; SU, M.; CHEN, Q.; et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 391–398, 2016.

ZHA, W. Transporter-mediated natural products e drug interactions for the treatment of cardiovascular diseases. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. December, 2017.

ZHANG, F.; LIN, L.; XIE, J. A mini-review of chemical and biological properties of polysaccharides from *Momordica charantia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. 235, p. 246–253, 2016.

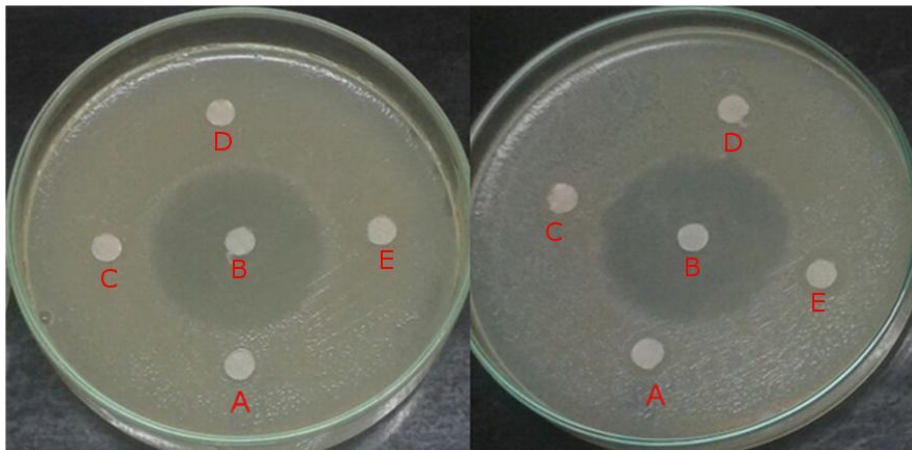
ZHANG, W.; ZENG, G.; PAN, Y.; et al. Properties of soluble dietary fiber-polysaccharide from papaya peel obtained through alkaline or ultrasound-assisted alkaline extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 172, p. 102–112, 2017.

ZHAO, C.; LI, X.; MIAO, J.; et al. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 847–856, 2017.

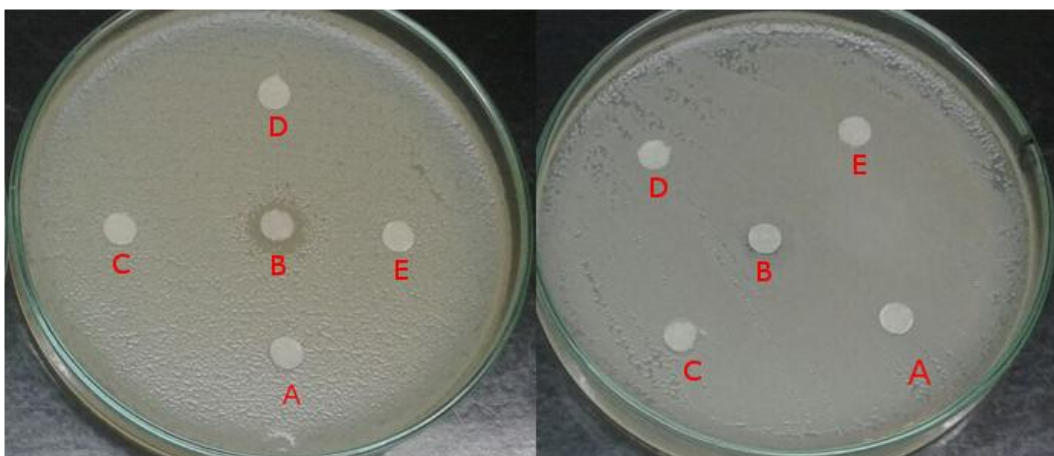
ZHAO, G.; KAN, J.; LI, Z.; CHEN, Z. Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 2, p. 125–131, 2005.

APÊNDICES

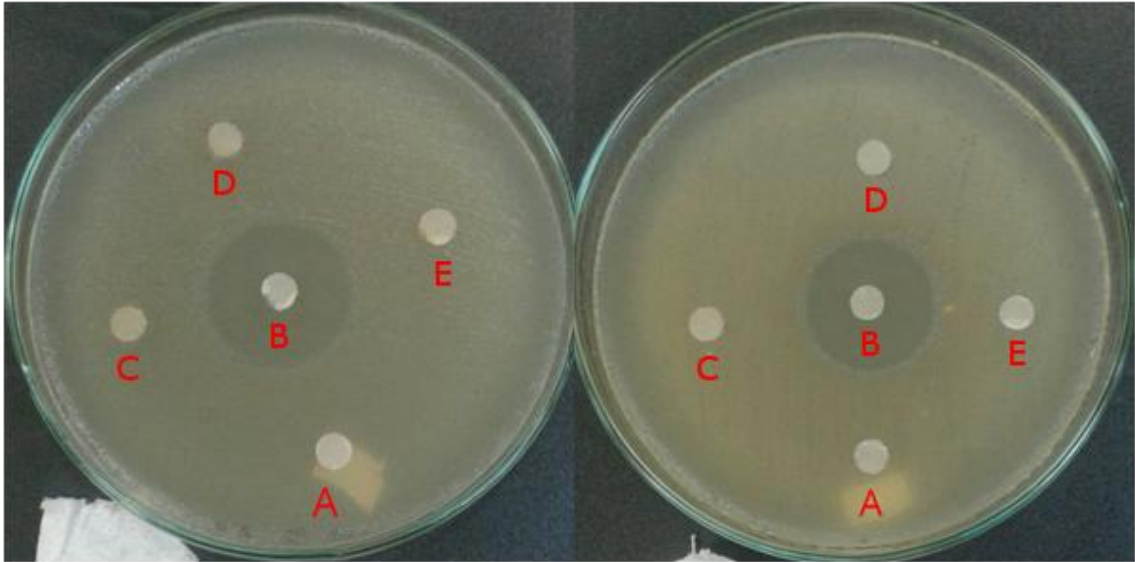
Apêndice A - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



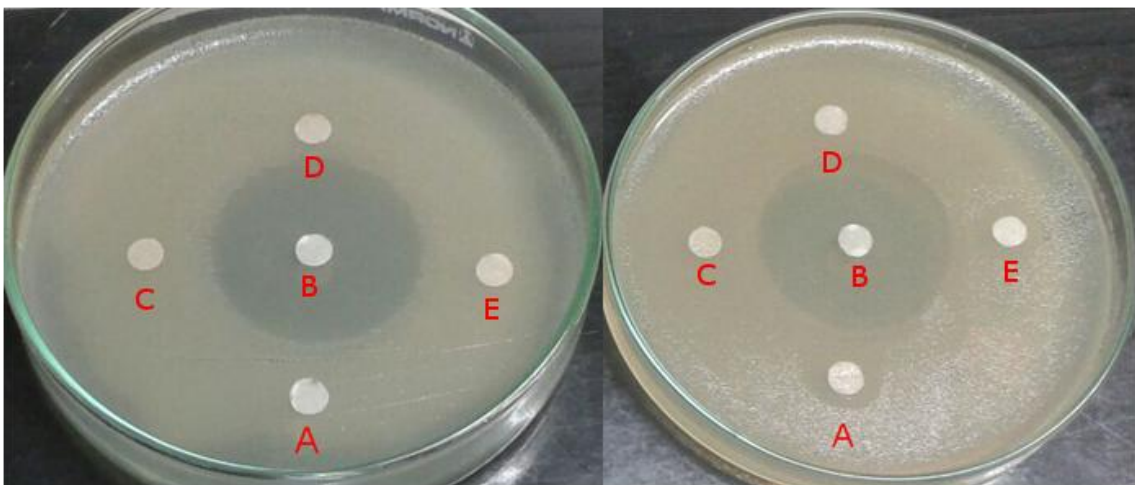
Apêndice B - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



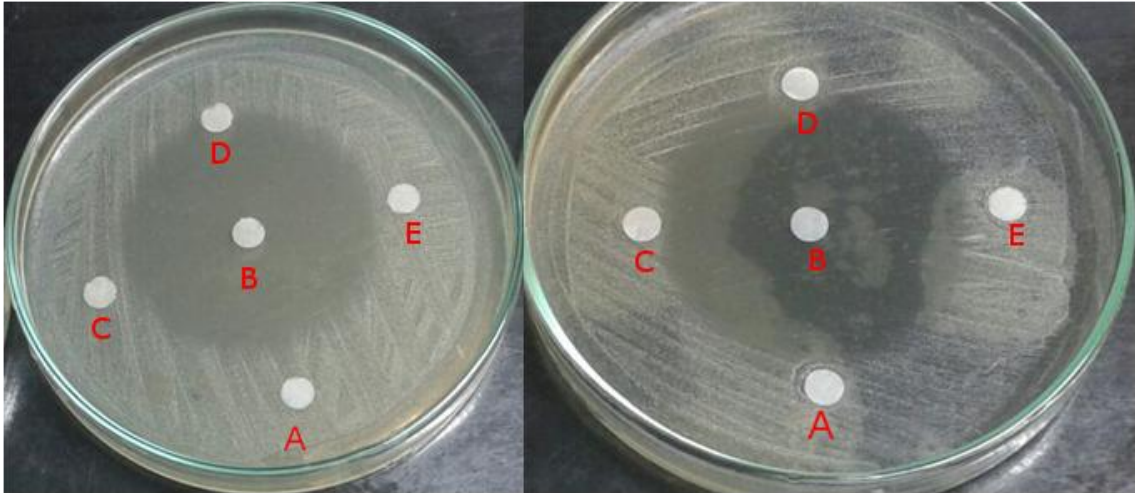
Apêndice C - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Campylobacter jejuni* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



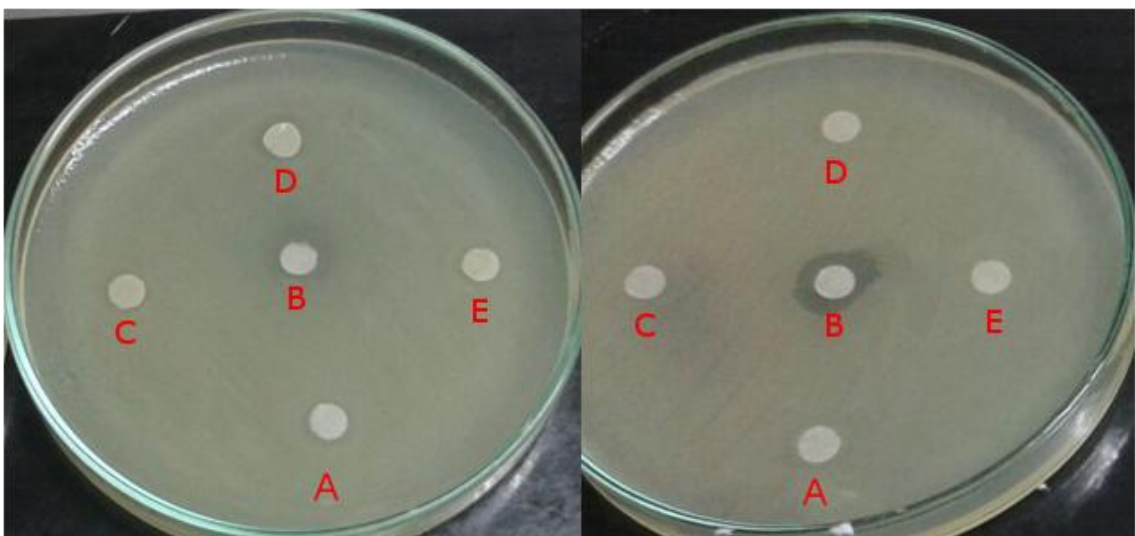
Apêndice D - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Salmonella gallinarium* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



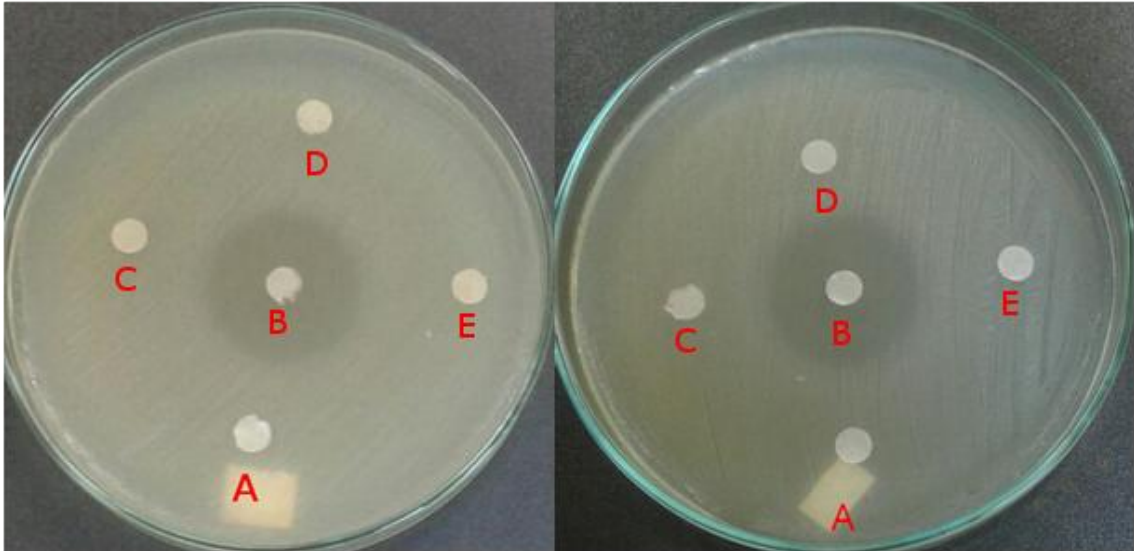
Apêndice E - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecium* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



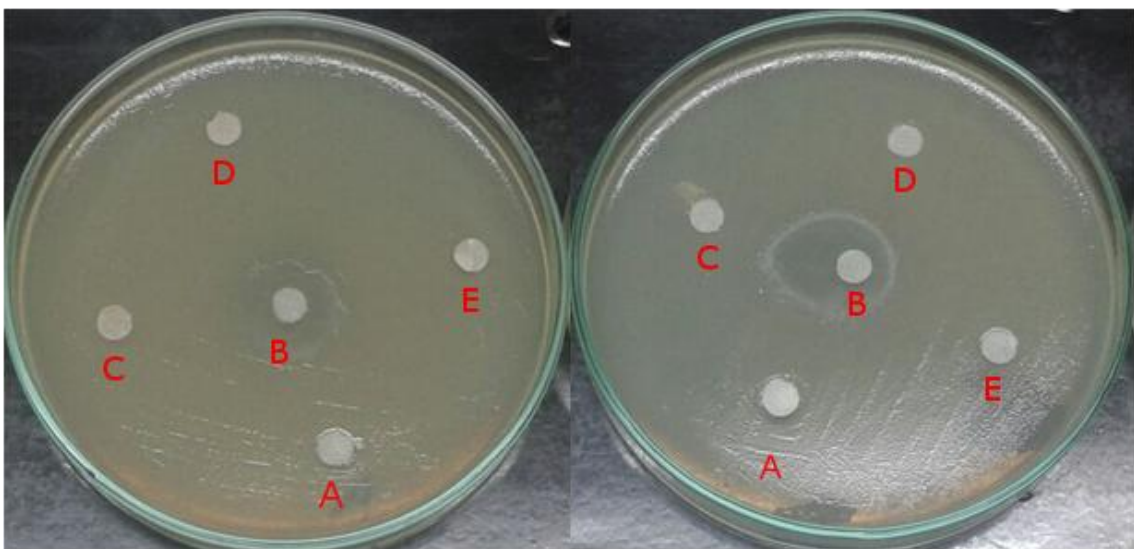
Apêndice F - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Proteus mirabilis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



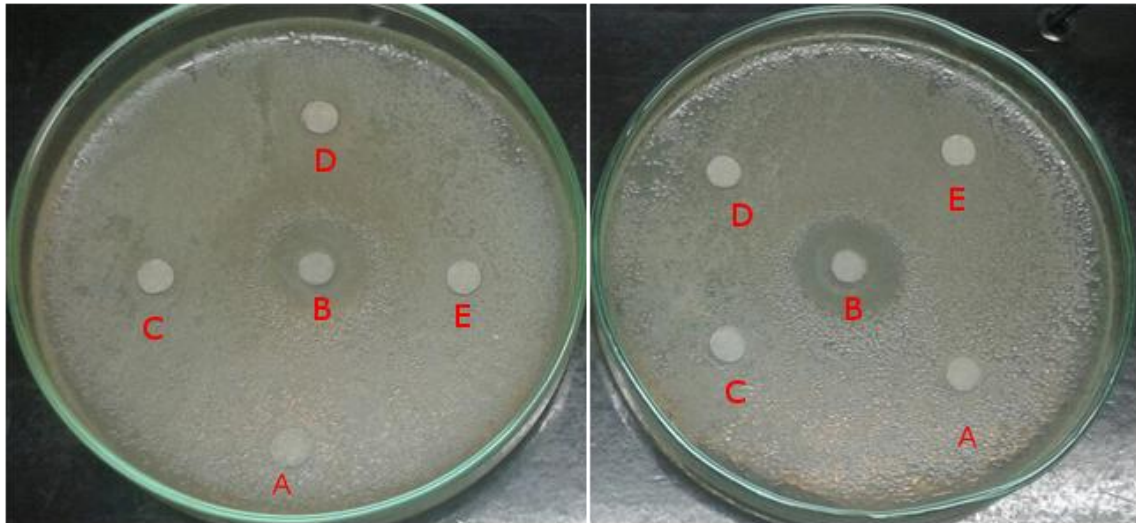
Apêndice G - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



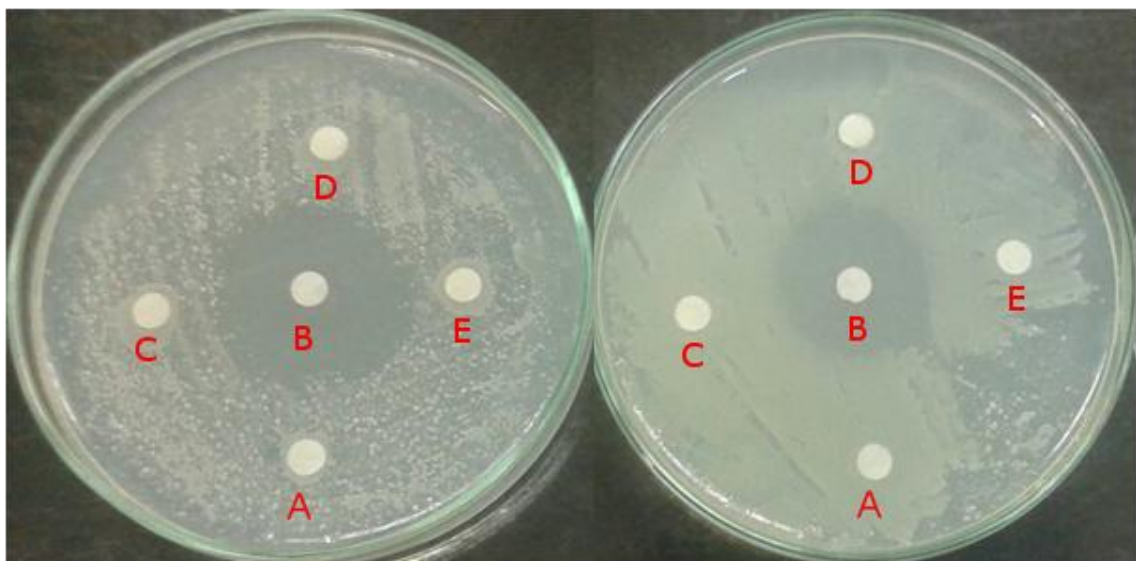
Apêndice H - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Salmonella enteritidis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



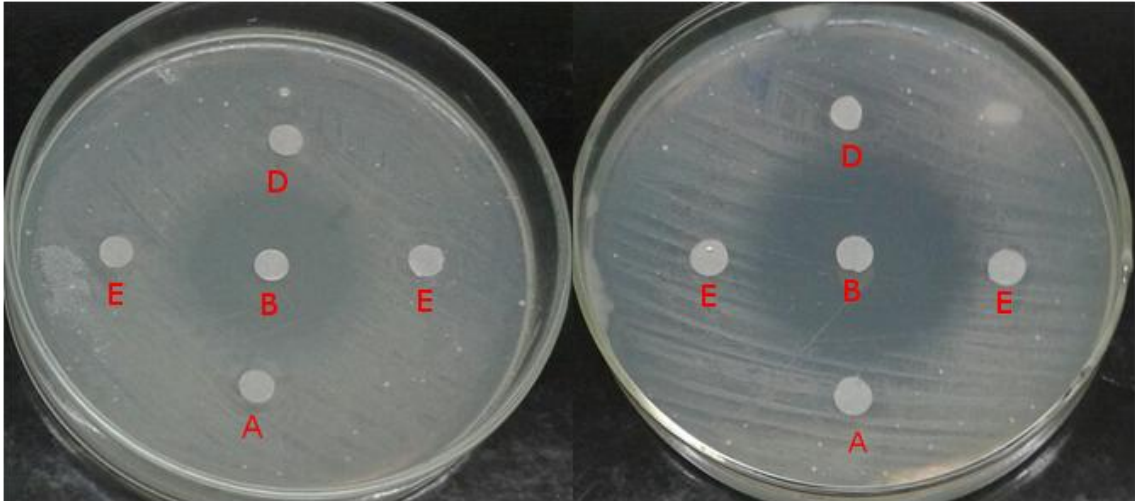
Apêndice I - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



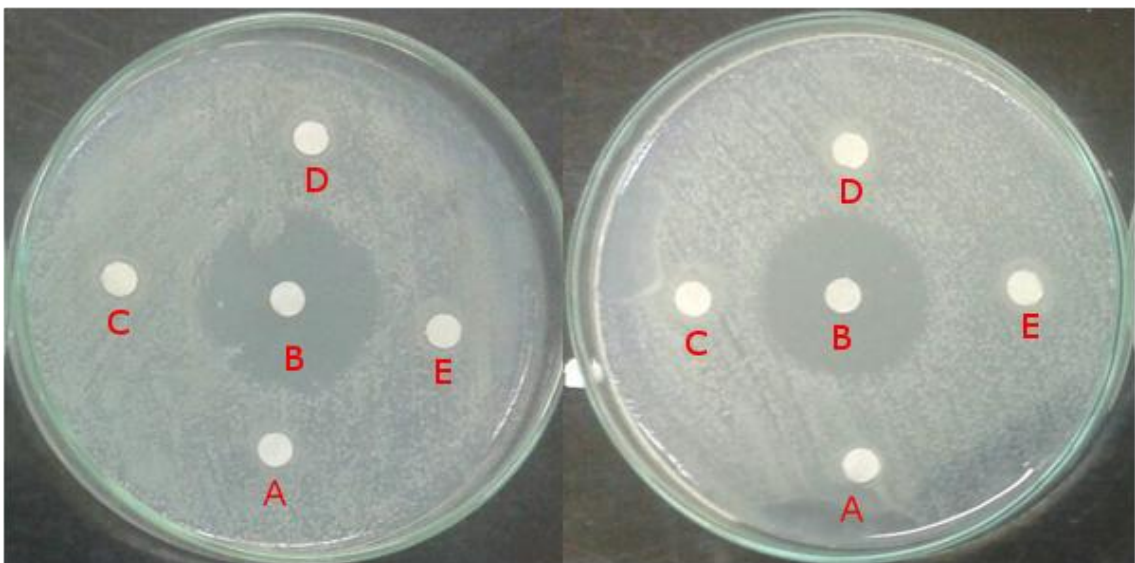
Apêndice J - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



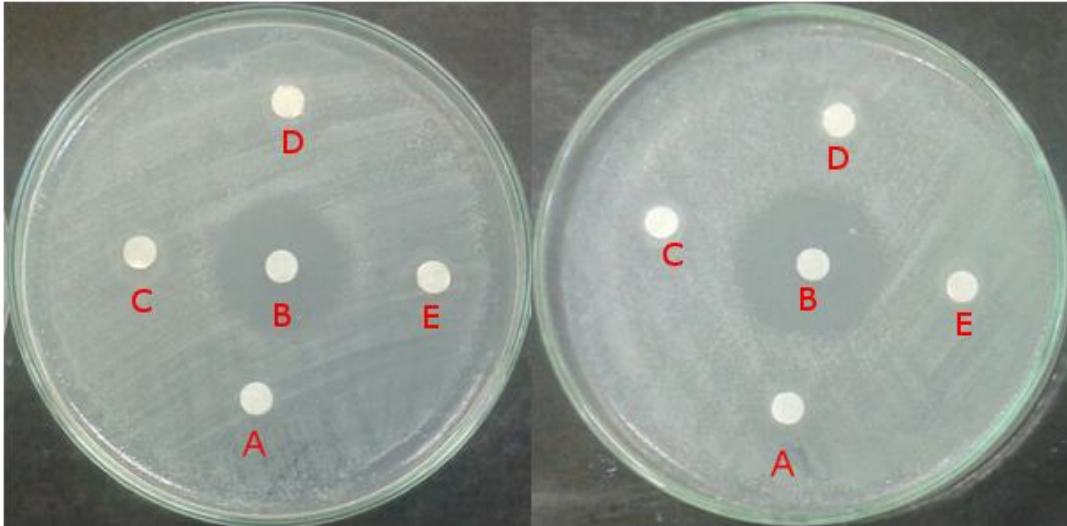
Apêndice K - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



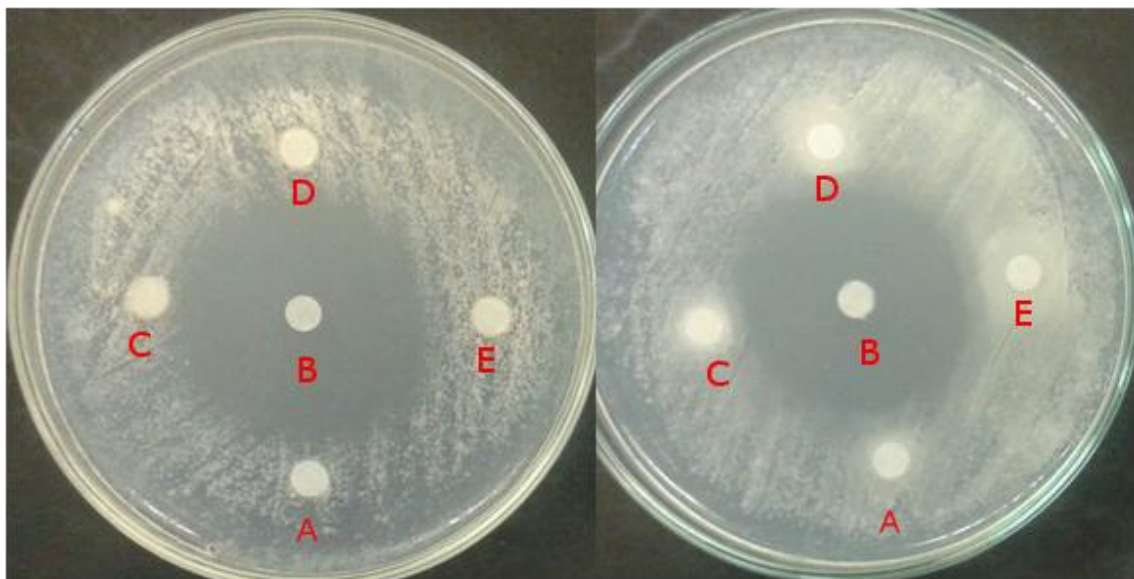
Apêndice L - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Salmonella bongori* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



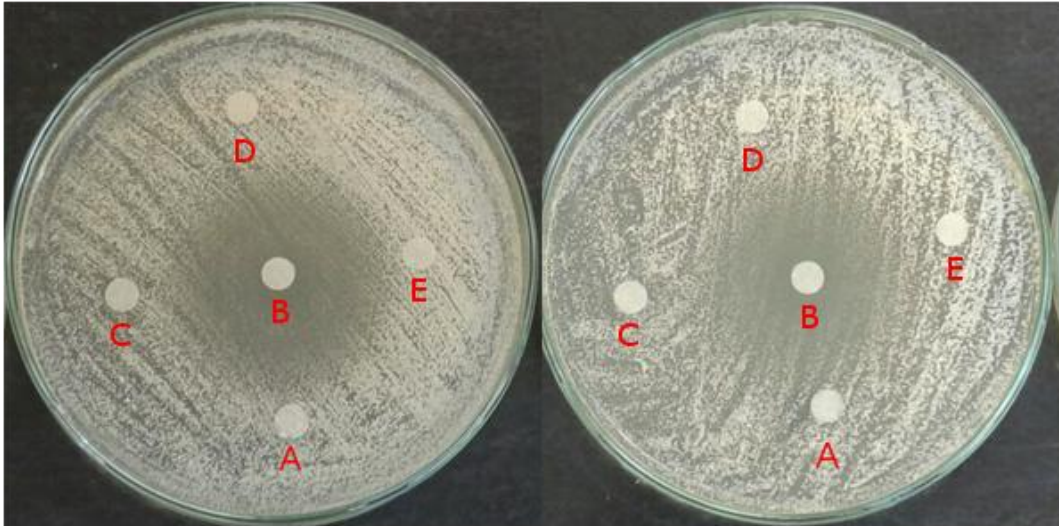
Apêndice M - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



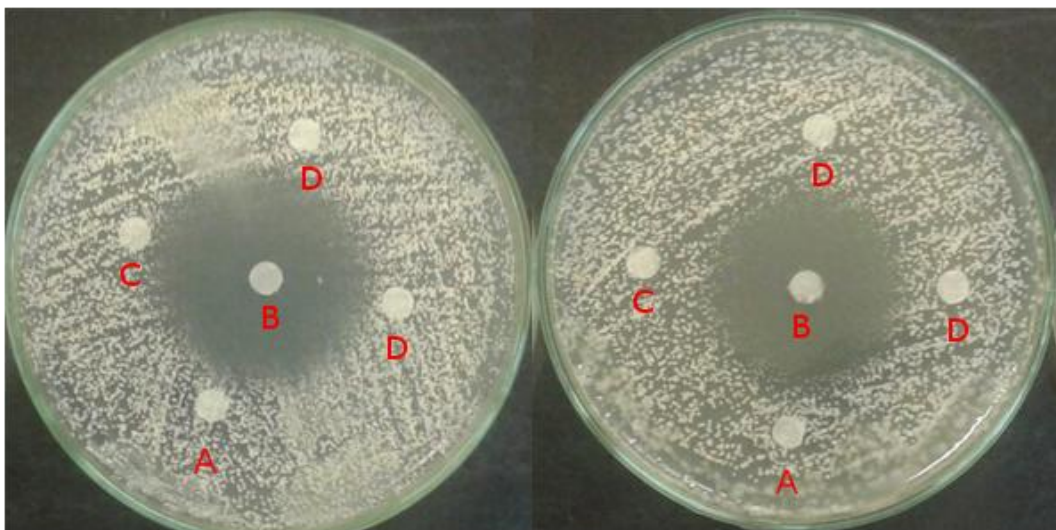
Apêndice N - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



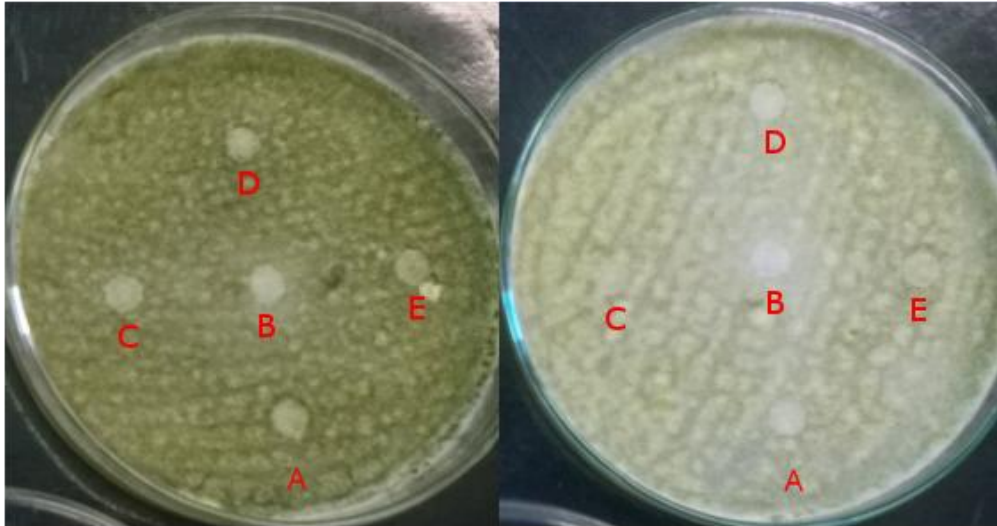
Apêndice O - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



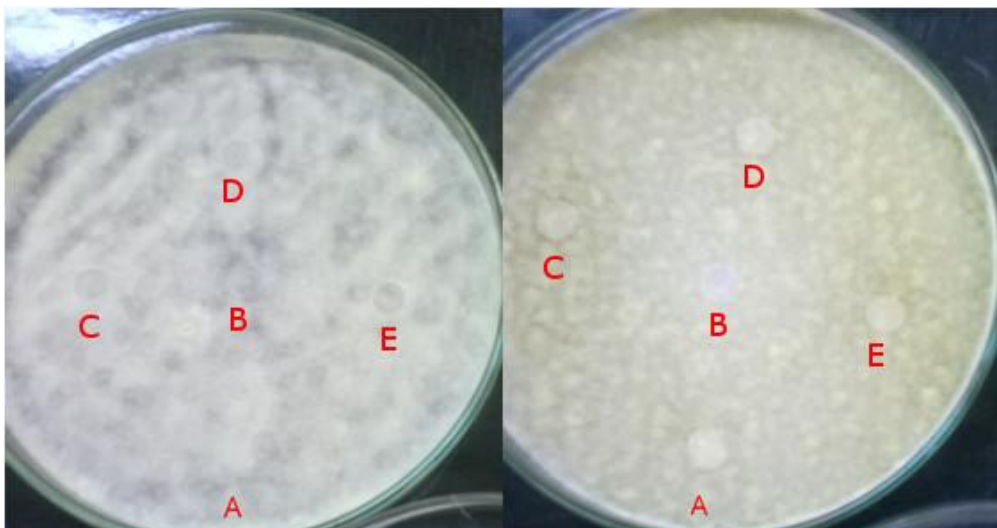
Apêndice P - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Candida tropicalis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



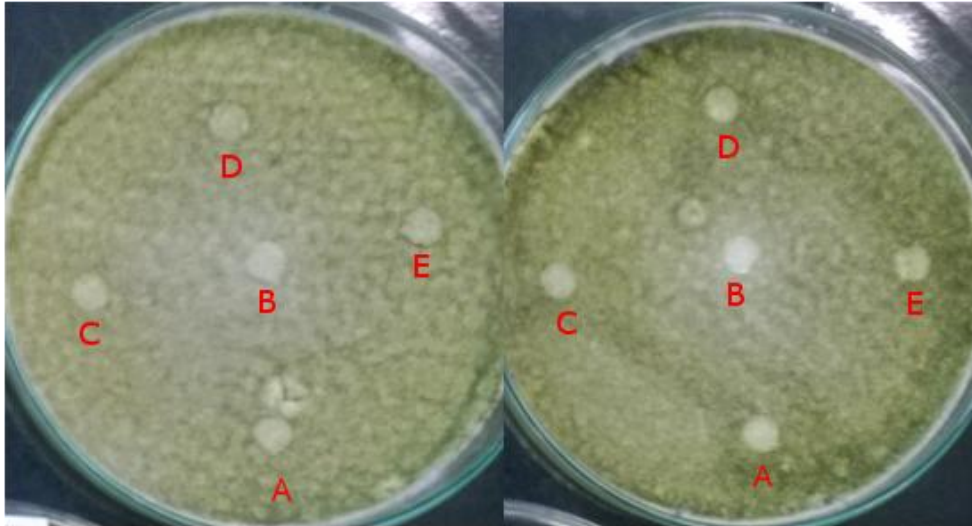
Apêndice Q - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Aspergillus niger* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



Apêndice R - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Aspergillus brasiliensis* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



Apêndice S - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Penicillium chrysogenum* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.



Apêndice T - Determinação da atividade antimicrobiana frente a *Penicillium expansum* por disco difusão das amostras PND e PD, respectivamente. Onde A indica o disco embebido com água. Onde A indica o disco embebido com água; B o disco com o antimicrobiano; C, D e E os discos embebidos com as amostras.

