



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



ALESON PEREIRA DE SOUSA

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA DIOSCORINA DE INHAME
(*Dioscorea cayennensis*): CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS

JOÃO PESSOA

2017

ALESON PEREIRA DE SOUSA

**OBTENÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA DIOSCORINA DE INHAME
(*Dioscorea cayennensis*): CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas da Natureza da, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientador:

Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

**JOÃO PESSOA
2017**

S725o Sousa, Aleson Pereira de.
Obtenção da Fração Proteica Dioscorina de inhame
(*Dioscorea cayennensis*): caracterização bioquímica e
atividades biológicas / Aleson Pereira de Sousa. - João
Pessoa, 2017.
61 f. : il. -

Orientador: Carlos Alberto de Almeida Gadelha.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Proteínas. 2. Compostos bioativos. 3. Dioscorina.
4. Antibacteriano. 5. Antioxidanteaz. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 577.112(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

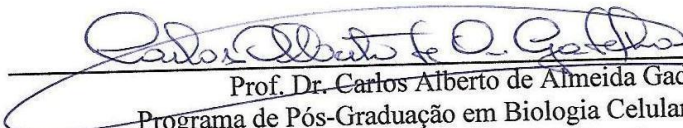


PARECER DA BANCA DE EXAMINADORA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO

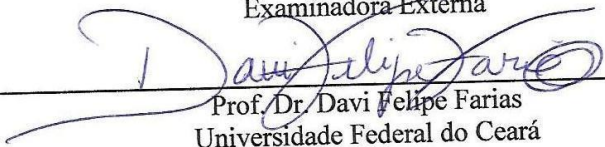
“Obtenção da Fração Proteica Dioscorina de inhame (*Dioscorea cayennensis*): Caracterização Bioquímica e Atividades Biológicas”

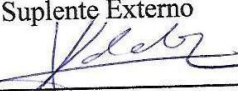
ALESON PEREIRA DE SOUSA

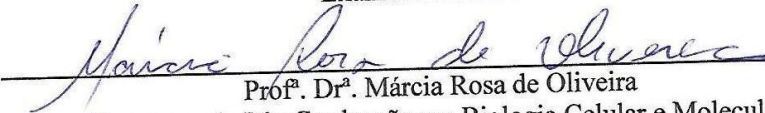
Dissertação de Mestrado avaliada em 18/04/2017
A Banca Examinadora considera o candidato **APROVADO**.


Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Katya Anaya Jacinto
Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Examinadora Externa


Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Universidade Federal do Ceará
Suplente Externo


Prof.^a. Dr.^a. Daniela Priscila Marchi Salvador
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna


Prof.^a. Dr.^a. Márcia Rosa de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interna

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Gomes e Luzia Meiridark, por toda a torcida e suporte nas minhas constantes buscas de aperfeiçoamento profissional, sempre estimulando a minha perseverança e paciência para plantar e colher os frutos do trabalho.

Ao meu irmão Anderson Israel, por cuidar dos meus pais e ser um bom filho no período de ausência que fiz em casa para dedicar-me a essa etapa profissional, muito obrigado irmão.

Aos meus amigos, em especial à Guilherme Coutinho, pelo incentivo e acolhimento nessa transição pessoal e profissional, obrigado por passar sempre toda essa segurança e tranquilidade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família pela presença, apoio e contribuição, em mais uma etapa de realização profissional, especialmente à minha mãe Luzia Meiridark e o meu pai José Gomes que depositaram em mim paciência, fé e perseverança.

Quero agradecer à todos os meus amigos, tantos os que conquistei durante o período de pós-graduação (Rodrigo, Thales, Rosana, Soares, Taliana, Kátia, Malanna, Talita, Íris, Dayene, Vinícius, Luiz Henrique, Layane, André, Felipe e Amanda); quanto aos que sempre estiveram comigo na expectativa e torcida para realização desta etapa (Guilherme, Sandro, Marília, Thamires, Nair, Sabrina, Júnior Antero, Niedja, Ertênia, Franciélia, Raffaella Herman, Rogério, José Frankneto, Maysllanne, Marcos Soares e Aianne). Sei que algumas ausências se fazem necessárias para nosso crescimento e evolução, agradeço toda a compreensão de vocês. Considero muito toda estima e carinho que vocês têm me dado.

Terei que fazer um agradecimento especial a dois amigos que foram de grande importância para construção desta etapa; primeiro ao amigo Sandro Mascena que me apresentou o professor Carlos Alberto, possibilitando a carta que foi a chave para entrada na seleção do mestrado, Sandro sempre me mostrou o lado encantador da pesquisa. Também quero agradecer a Guilherme Coutinho que me ajudou de forma significativa antes e durante a conclusão dessa etapa, obrigado por todo o suporte, ajuda nas horas difíceis, pelo acolhimento na mudança para cidade de João Pessoa, serei eternamente grato.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa pelo acolhimento e troca de conhecimento, Edilza em especial por sua parceria/paciência e auxílio na condução dos experimentos, Samara, Namíbia, Annie, Kamila e Júlia pelo companheirismo em bancada, muito obrigado.

Ainda sobre a construção do trabalho agradeço aos nossos colaboradores as professoras: (Marta Madruga, Edeltrudes, Darlene, Kristina Lira, Mirella) pelo auxílio e ajuda em experimentos que contribuíram com a pesquisa. Agradecimento a professora Tatiane Santi que abriu as portas do seu laboratório (BioGer) contribuindo com a realização dos experimentos da pesquisa, obrigado!

Também devo lembrar de todos os bons amigos que fazem parte do laboratório (BioGer) cujo auxílio, troca de experiências foi importante durante a pesquisa, aos estagiários (Nathália, Carlos, Joice, Thaís e Matheus) a mestranda Maria Izabel obrigado.

Deixo minha afeição e as melhores realizações para todos os amigos que dividiram comigo esta jornada, mesmo com todos os problemas que tivemos que enfrentar durante o processo (Giulian, Franciele, Sarah, Diana, Vanessa, Natan, Laísa, Mayara Karla, Mayara Maia, Larissa, Rafaella, Mayara Cecile, Áthina, Otacílio, Karine, Antônia, Poliane, Rayana, Angélica e Jaíse).

O acolhimento e apoio durante vários lanches, cafés e conversas enriquecedoras que tive com minhas amigas do doutorado que gosto tanto (Edilza, Paula, Liliane e Karla).

Também serei grato ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha pela oportunidade de ter sua orientação, por me proporcionar acesso ao conhecimento que obtive durante a realização da pesquisa. Obrigado!

Aos demais professores que dividiram conosco o seu conhecimento nas disciplinas ministradas no programa (Darlene, Sávio, Mirella, Luiz Fernando, Bagnólia, Krystina Lira, Naila, Daniela, Tatiane e Carlos).

À todos os servidores que fazem parte do programa (Regina, Gláucia, Moreira, Geralda, Dione, Ludmila e Sr. Bosco).

Agradeço ainda ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação pelo financiamento do projeto “Proteômica e Atividades Biológicas de Proteínas e Peptídeos com Propriedades Funcionais de Inhames Brasileiros” (aprovado no Edital MCTI/CNPq/Universal Nº 14/2014 sob Processo Nº 461649/2014-4), Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP) pelo constante apoio ao Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM).

E por fim, agradeço a Deus pela oportunidade dada para realização deste trabalho e pela satisfação de colher o fruto desta conquista.

"Assim seguimos, completando ciclos, atravessando portas, em poder das chaves da vida e com as janelas abertas para a imensidão do futuro."

(Reggina Moon)

SOUSA, A. P. **Obtenção da Fração Proteica Dioscorina de inhame (*Dioscorea cayennensis*): Caracterização Bioquímica e Atividades Biológicas.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

RESUMO

Sementes, rizomas e tubérculos são geralmente boas fontes de moléculas bioativas, as quais estão relacionadas à promoção da saúde, as proteínas e outros compostos oriundos de fontes vegetais, vem ganhando relevância em pesquisas científicas. Considerando que o consumo do tubérculo de inhame (*Dioscorea cayennensis*) faz parte do hábito alimentar brasileiro, faz-se necessário o estudo das proteínas presentes neste vegetal. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bioquimicamente a fração proteica dioscorina (FPD) presente nos tubérculos de *D. cayennensis*, detectando a presença de compostos antinutricionais e atividades biológicas antioxidante, antibacteriana e antifúngica. O isolamento do FPD foi realizado com a extração proteica em Tris-HCl 0,05M pH 8,3, seguido de precipitação em Sulfato de Amônio (F₄₅₋₇₅). A massa molecular da FPD foi determinada por SDS-PAGE e MALDI-ToF. Caracterizado pela presença de um componente majoritário com massa de aproximadamente 28 kDa, correspondente a dioscorina. Quando submetida a testes de avaliação da presença de fitoquímicos e compostos antinutricionais (lectinas e inibidores de tripsina), não foi detectada na FPD a presença destes compostos avaliados. A composição aminoacídica da fração foi determinada e a atividade antioxidante estimada pelos métodos de ABTS e DPPH. Ácido glutâmico, Ácido Aspártico e Arginina foram os aminoácidos que apresentaram maiores teores na FPD, o que explica a atividade antioxidante verificada, sugerindo que a interação destes aminoácidos parece atuar em moléculas reativas tornando-as estáveis. Por fim, na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato total e FPD frente a diferentes cepas de micro-organismos, foi detectado potencial antibacteriano entre 50-500 µg/mL de proteína para inibição do crescimento da cepa *L. monocytogenes*.

Palavras-chaves: Compostos Bioativos, Proteínas, Dioscorina, Antibacteriano, Antioxidante.

SOUSA, A. P. **Obtaining Dioscorin Proteic Fraction of yam (*Dioscorea cayennensis*): Biochemical Characterization and Biological Activities.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ABSTRACT

Seeds, rhizomes and tubers are welcomed with sources of bioactive molecules, which are related to health promotion, such as proteins and other components of plant sources. (*Dioscorea cayennensis*) is part of the Brazilian food habit, it is necessary to study the proteins present in this plant. The objective of this work was to isolate and characterize biochemically the dioscorin proteic fraction (DPF) present in the tubers of *D. cayennensis*, characterizing the presence of antinutritional compounds and antioxidant, antibacterial and antifungal biological activities. Isolation of DPF was performed with protein extraction in Tris-HCl 0.05M pH 8.3, followed by precipitation in Ammonium Sulfate (F₄₅₋₇₅). The molecular weight of DPF was determined by SDS-PAGE and MALDI-ToF, characterized by the presence of a major component with a mass of approximately 28 kDa corresponding to dioscorin. When tested for the presence of phytochemicals and antinutritional compounds (lectins and trypsin inhibitors), the presence of these compounds was not detected in the DPF. The amino acid composition of the fraction was determined and the antioxidant activity estimated by the ABTS and DPPH methods. Glutamic acid, Aspartic acid and Arginine were the amino acids that showed higher levels in DPF, which explains the antioxidant activity, suggesting that the interaction of these amino acids seems to act on reactive molecules making them stable. Finally, in the evaluation of the antibacterial and antifungal activity of the total extract and DPF against different strains of microorganisms, an antibacterial potential was detected between 50-500 µg/mL of protein for inhibition of the growth of strain of *L. monocytogenes*.

Key-words: Bioactives Compounds, Proteins, Dioscorin, Antibacterial, Anti-fungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

- Figura 1.** Produção de inhame *Dioscorea cayennensis* na América do Sul e Brasil 16

Artigo

- Figura 1.** Fluxograma de obtenção da farinha ultrafina (FU) 29
- Figura 2.** Padrão eletroforético de Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina em SDS-PAGE 37
- Figura 3.** Padrão de espectrometria de massas da Fração Proteica Dioscorina obtido por MALDI-ToF 38
- Figura 4.** Atividade antioxidante de Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina 42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1. Taxonomia do inhame <i>Dioscorea spp.</i>	15
Tabela 2. Massa molecular da dioscorina em diferentes espécies de inhames	21
Tabela 3. Atividade biológica em espécies de inhame <i>Dioscorea spp.</i>	22

Artigo

Tabela 1. Teores de proteínas solúveis do Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina	35
Tabela 2. Etapas de isolamento do Fração Proteica Dioscorina	36
Tabela 3. Caracterização fitoquímica do Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina	40
Tabela 4. Determinação da presença de compostos antinutricionais no Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina	40
Tabela 5. Composição de aminoácidos totais (mg/g de proteína) da Fração Proteica Dioscorina	44
Tabela 6. Avaliação da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina contra cepas de bactérias e de fungos	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μM	Micromolar
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BHI	Brian Heart Infusion
D	Dalton
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HCl	Ácido clorídrico
kDa	Quilodalton
M	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
mgP/mL	Miligrama de proteína por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Caracterização botânica e nutricional do inhame <i>Dioscorea spp</i>	15
1.2 Cultivo e utilização de raízes e tubérculos	16
1.3 Proteínas vegetais em tubérculos	19
1.4 Atividades biológicas de proteínas do inhame <i>Dioscorea spp</i>	21
1.4.1 Atividade Anti-Inflamatória	22
1.4.2 Atividade Antifúngica	23
1.4.3 Atividade Antitumoral	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. RESULTADOS	26
ARTIGO	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 METODOLOGIA	28
2.1 Materiais	28
2.2 Separação da Mucilagem e Extração de Proteínas	28
2.3 Precipitação de Proteínas – Salting Out	28
2.4 Determinação de Proteínas Solúveis	30
2.5 Análise Fitoquímica	30
2.6 Determinação da Massa Molecular – Eletroforese SDS-Page	30
2.7 Determinação da Massa Molecular - Espectrometria de Massa (MALDI-ToF)	31
2.8 Composição de Aminoácidos	31
2.9 Detecção de Compostos Antinutricionais	32
2.9.1 Atividade Lectínica	32
2.9.2 Atividade Anti-tríptica	32
2.10 Atividade Antioxidante	33
2.10.1 Sequestro do radical ABTS	33
2.10.2 Sequestro do radical DPPH	33
2.11 Atividade Antibacteriana e Antifúngica	33

2.11.1 Culturas microbianas	33
2.11.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	34
2.12 Testes estatísticos	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Extração Proteica e Obtenção da FPD	35
3.2 Isolamento da FPD	36
3.3 Caracterização Fitoquímica	38
3.4 Avaliação de Fatores Antinutricionais Proteicos	40
3.5 Atividade Antioxidante	41
3.6 Composição de Aminoácidos	43
3.7 Atividade Antibacteriana e Antifúngica	45
4 CONCLUSÃO	46
5 AGRADECIMENTOS	47
6 REFERÊNCIAS	47
4 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização botânica e nutricional do inhame *Dioscorea spp.*

O inhame pertence à família *Dioscoreaceae*, cujo gênero, *Dioscorea*, possui mais de 600 espécies e variedades, com fácil adaptação às regiões de clima tropical. Dessas, 14 espécies têm seus rizóforos/tubérculos utilizados como alimento, sendo *D. esculenta*, *D. cayennensis*, *D. alata* e *D. rotundata* as mais cultivadas (KASASIAN, 1978; HEREDIA; VIEIRA; MINUZZI, 2000; MONTEIRO; PERESSIN, 2002; BRESSAN, 2005). A classificação taxonômica da planta foi descrita pelo Serviço de Conservação e Pesquisa Naturais (NRCS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 2016 (Tabela 1).

Tabela 1. Taxonomia do inhame (*Dioscorea spp.*)

Classificação	Nome Científico – Nome Comum
Reino	Plantae – Plantas
Sub-reino	Tracheobionta – Plantas Vasculares
Subdivisão	Spermatophyta – Plantas de Sementes
Divisão	Magnoliophyta – Plantas de Florescência
Classe	Liliopsida – Monocotiledôneas
Subclasse	Liliidae
Ordem	Liliales
Família	Dioscoreaceae – Família do Inhame
Gênero	<i>Dioscorea</i> L. – Inhame

Fonte: USDA, 2016.

Esses tubérculos, do ponto de vista nutricional, são ricos em carboidratos (amido), proteínas, vitaminas e minerais (fósforo, cálcio e ferro), além de vários componentes como ácidos orgânicos. Entre as vitaminas, encontra-se presente a tiamina (B1), a piridoxina (B6) e a vitamina C. Além disso, possui baixo conteúdo lipídico e baixo índice glicêmico, sendo facilmente assimilado pelo organismo e indicado à pacientes com diabetes no controle da hiperglicemia (RAMOS FILHO, et al., 1997; HEREDIA; VIEIRA; MINUZZI, 2002; LEONEL; CEREDA, 2002; HUANG; CHEN; WANG, 2007).

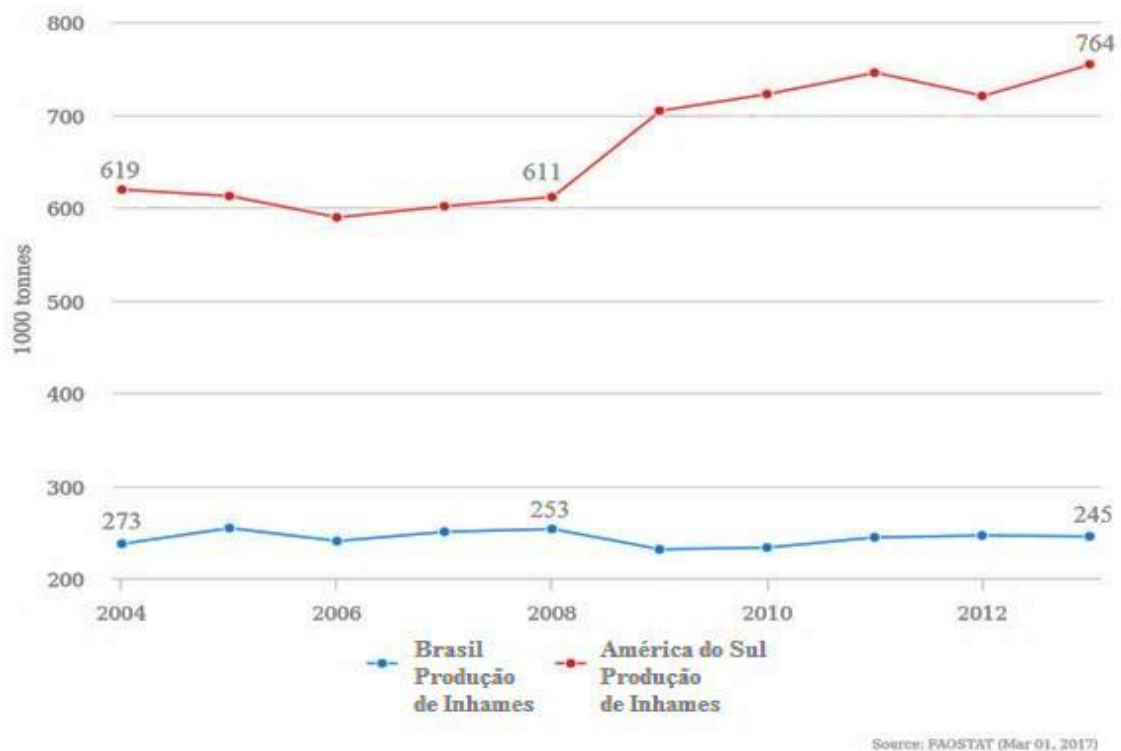
Segundo MOURA (2006), o cará da costa ou inhame da Costa (*Dioscorea cayennensis*), o inhame mais comercializado no Brasil, se caracteriza por possuir caule herbáceo, escandente (trepador), com formação de tubérculos em seu sistema radicular rizomático (MESQUITA, 2002). Na última década, vem sendo desenvolvidos produtos a base de farinha para o preparo de massas e outros produtos minimamente processados (TAVARES, 2009; BRITO et al., 2011; MONTEIRO, 2013).

1.2 Cultivo e utilização de raízes e tubérculos

A produção de alimentos naturais ricos em nutrientes para o consumo ganha espaço no mercado, uma vez que a população passou a buscar hábitos alimentares mais saudáveis. O cultivo de raízes e tubérculos como batata (*Solanum tuberosum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*) e inhame (*Dioscorea spp.*) apresenta vital importância nos países localizados nos trópicos úmidos e subúmidos onde não há grande produção de cereais (DIOP; CALVERLEY, 1998). Tais culturas desenvolvem-se bem em condições climáticas e de solo ideais ou seja, com precipitações pluviométricas anuais variando de 1.000 a 1.600 milímetros, gradiente térmico de 24 a 39 °C e umidade relativa do ar variando de 60-70% (SANTOS et al., 2007).

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), em 2014 o Brasil ocupou o segundo lugar no ranking de maior produtor de inhame da América do Sul, com uma produção estimada em aproximadamente 245.000 t em 2013 (Figura 1).

Figura 1. Produção de inhame *Dioscorea cayennensis* na América do Sul e Brasil



Fonte: FAO, 2017.

A produção de inhame tem se desenvolvido mundialmente em solos de países com condições climáticas favoráveis. O continente africano foi responsável em 2014 por 96% da produção e 95,4% da área plantada mundial (FAO, 2014). Neste, a Nigéria destacou-se como maior país produtor com 7.115.500 t distribuídas em 2.889.050 ha, perfazendo uma média de 12,84 t/ha. Embora seja o maior produtor, a Nigéria não detém a maior produtividade; pois países com melhor nível tecnológico como o Japão, apresentam produtividade relativa da ordem de 23,76 t/ha (FAO, 2014).

Segundo BRITO et al. (2011), cerca de 32% do total produzido de tubérculos de inhame no continente sulamericano veio do Brasil, sendo a região nordeste aquela que apresenta a maior produção nacional de inhame, com destaque para os estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Maranhão. Nesses estados, as condições edafoclimáticas (relativas a clima e solo) são ideais e favoráveis ao cultivo e produção do inhame. Isso justifica a maior concentração da produção na região nordeste, onde vivencia-se o aumento da atividade agrícola com potencial promissor de expansão comercial dessa cultura. Apesar de possuir um consumo demandado pelo mercado interno (regional), o qual atualmente, absorve a maior parte da produção, existe a comercialização do tubérculo para o mercado externo, representando uma importante opção de negócio em função dos preços oferecidos (MENDES et al., 2013).

Na produção dos campos da região nordeste do Brasil, predomina o cultivo de inhames das espécies *Dioscorea cayennensis* e *Dioscorea rotundata*. O primeiro conhecido é o cará-da-costa ou inhame-da-costa; já na região sudeste do país, predomina o cultivo do inhame *Dioscorea alata*, conhecido popularmente como cará de São Tomé (ANDRADE, 2007). Juntos, os estados de Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo, respondem por um total de 90% da produção total de inhames do país (MESQUITA, 2001).

Os produtos advindos do cultivo dessas plantas são: as fibras, extraídas das partes aéreas comestíveis (folhas), e a fécula, produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis (tubérculos, raízes e rizomas) (BRASIL, 1978).

Além do consumo dos tubérculos e rizomas, as folhas de tais plantas são utilizadas em alguns países da África para fabricação de farinha, servindo como complemento nutricional da dieta regular (AWOYINGA et al., 1995). Apesar do elevado potencial nutritivo dessas folhas, seu consumo pode ser limitado devido a possibilidade de presença de fatores antinutricionais, como ocorre nas folhas da mandioca (*Manihot esculenta*), que possuem lectinas, entre outras moléculas bioativas que podem alterar o processo digestivo do consumidor (SILVA; SILVA, 2000).

A maior parte da produção nacional de inhame é direcionada à culinária. Sendo aproveitada em sua maioria o tubérculo, que é um alimento bastante utilizado no preparo de sopas, misturas para pães, cozidos com carnes e assados. Sendo assim, o inhame é um alimento bastante popular, principalmente nas regiões do norte, nordeste e sudeste brasileiro (MONTEIRO, PERESSIN, 2002).

Dentre as muitas espécies de inhames cultivadas e exploradas comercialmente no Brasil, *D. cayennensis* se destaca. Essa espécie apresenta casca marrom, polpa granulosa e conformação alongada dos rizomas. Ainda apresenta alto valor calórico, sendo rico em proteínas e em elementos tais como fósforo e potássio. A cultura ocupa, na cadeia alimentar das regiões tropicais, a mesma posição que a batata ocupa nas regiões temperadas (MONTEIRO, PERESSIN, 2002).

A fécula proveniente do inhame, diferentemente daquela produzida a partir do trigo, centeio, cevada e da aveia, apresenta a vantagem de não possuir glúten, sendo ideal para o consumo por doentes alérgicos celíacos (ANDRADE, 2007).

O inhame cresce bem em solos de textura arenosa e média, suficientemente profundos, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matéria orgânica, que permitem um melhor desenvolvimento de seus tubérculos (SANTOS, 1996; SANTOS 2002; SANTOS et al., 2006).

A forma de cultivo influencia diretamente nas características bromatológicas dos tubérculos, desenvolvendo propriedades essenciais para se classificar a batata, mandioca ou inhame em relação a sua aptidão de uso (fritura, cozimento, massa). A composição química também pode variar em função de fatores como condições climáticas, práticas culturais, condições do solo, estado de maturação, efeito do armazenamento e sobretudo, do tipo de adubação empregada no cultivo (PEREIRA; COSTA, 1997).

A qualidade do produto final pode ser determinada pela composição química e bioquímica dos tubérculos (PESHIN, 2000). Embora as características físicas e bioquímicas dos tubérculos estejam sob controle genético e sob influência do ambiente, elas tendem a ser constantes em uma mesma cultivar. Assim, cada cultivar possui características peculiares, o que evidencia a necessidade de identificá-las em relação a sua melhor forma de utilização, bem como das possíveis atividades biológicas de suas moléculas, sobretudo de macromoléculas como as proteínas.

1.3 Proteínas vegetais em tubérculos

Substâncias químicas presentes em alimentos, os nutrientes, são necessárias à vida. Essas possuem funções cruciais às células que constituem os organismos, tais como: crescimento, manutenção e reparo celular. Os nutrientes são divididos em dois grupos: os macronutrientes (proteínas, lípidos e carboidratos) e os micronutrientes (vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais e ácidos graxos). A ingestão e absorção de todos os nutrientes é essencial à promoção e manutenção da saúde ao longo do período de vida, devendo ser equilibrada e realizada em função das necessidades do organismo de modo a reduzir a prevalência de diversas doenças (STIPANUK; CAUDILL, 2013).

As proteínas são macromoléculas constituídas pela união de aminoácidos exercendo funções biológicas diversas nas células e organismos. Tais macromoléculas podem se diversificar através da sequência aminoacídica e conformação tridimensional da cadeia peptídica, resultante do processo de formação da proteína. Sendo este o principal objeto de estudo de químicos e bioquímicos ao longo dos anos. As moléculas proteicas são capazes de ligar substratos, transportar informações e moléculas para as células, ativar ou inibir substratos exercendo funções cruciais na atividade enzimática dos organismos (SHARON; LIS, 2001).

Baseado nessa premissa, estudos relacionados ao consumo de alimentos com propriedades nutricionais que contribuam para a saúde das populações, ingestão de nutrientes que apresentam alto teor de proteínas, vitaminas e minerais; tem sido considerado de grande importância para a comunidade (VIDAL et al., 2012). Todavia, algumas moléculas presentes nestes alimentos, podem apresentar substâncias consideradas antinutritivas e/ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, saponinas, inibidores de proteases e as lectinas (SILVA et al., 2000).

Dentre tais fatores antinutricionais, os principais de natureza proteica são os inibidores de proteases e as lectinas, os quais afetam o metabolismo basal e/ou crescimento de diferentes espécies animais (PUSZTAI et al., 1997; ARMOUR et al., 1998; SILVA; SILVA, 2000).

Os efeitos nocivos dos inibidores de proteases presentes em alimentos são complexos. Vários estudos têm atribuído efeitos deletérios, principalmente alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento, à presença de inibidores de proteases em fontes alimentícias provenientes de leguminosas e hortaliças (ALETOR; ADEOGUN, 1995; SILVA et al., 2000).

Uma dieta equilibrada deve conter proteínas, sobretudo, as de origem animal, que possuem maior valor biológico em relação as advindas de fontes vegetais. Porém, as populações

de baixo poder aquisitivo têm acesso limitado a alimentos ricos em proteínas de origem animal. A identificação de espécies vegetais ricas em proteínas e incentivos de cultivo e consumo destas espécies podem vir a contribuir para diminuir as deficiências nutricionais das populações fornecendo alternativas nutricionais variadas, especialmente para aqueles com hábitos e dietas alimentares diferenciados (ASZTALOS et al., 2006).

As proteínas extraídas principalmente das folhas das plantas são denominadas *leaf proteins* (proteínas foliares) e são encapsuladas e utilizadas por adeptos a dietas ricas em alimentos naturais, especialmente no caso de consumo das plantas, herbáceas, podendo ser consumido/extraído das plantas inteiras (FERNANDO, 1980).

Além do interesse do ponto de vista nutricional, tais moléculas biológicas têm sido bastante exploradas quanto ao seu potencial em aplicações biotecnológicas envolvendo as áreas de agropecuária, nutrição, saúde e produtos químicos industriais (VIDAL et al., 2012).

A busca por aplicações e descobertas destes novos produtos naturais envolve a investigação biológica da estrutura de carboidratos presentes em diversas células (SILVA; SILVA, 2000). Para esse tipo de estudos, utiliza-se matrizes cromatográficas comerciais de afinidade na caracterização e purificação destes polissacarídeos e/ou glicoconjugados (LIMA et al., 1997).

Neste contexto, as lectinas, moléculas proteicas bioativas advindas de produtos naturais, têm sido amplamente empregadas na caracterização de grupos sanguíneos, principalmente por bancos de sangue (SHARON; LIS, 1998). Ainda verifica-se que as lectinas possam avaliar a estimulação da mitogênese de linfócitos, abrindo novas perspectivas no campo da imunologia (SHARON; LIS, 2004).

A ação em células cancerígenas, sendo utilizadas nos estudos de oncogênese (SHARON; LIS, 2004); e como agentes defensivos na agricultura, em função de sua ação fungicida, bactericida e inseticida (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2002; PEUMANS et al., 2000).

Produtos naturais contendo fatores antinutricionais como lectinas podem reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas células intestinais, exercendo sua função de ligação. Devido a ligação destas moléculas aos receptores glicosilados das células intestinais, tais proteínas interferem na digestão, absorção e utilização de nutrientes, devido à paralisação do transporte dos nutrientes e à absorção de substâncias nocivas. No entanto, o exato mecanismo de ação de muitas dessas moléculas ainda não elucidado, logo há necessidade de realizar pesquisas que possam auxiliar na determinação destes processos moleculares (CZAPLA, 1997; NEVEL et al., 1998; TINJUANGUJUN, 2002).

1.4 Atividades biológicas das proteínas do inhame *Dioscorea spp.*

Plantas de raízes tuberosas são vulneráveis a estresses causados pela natureza abiótica, principalmente aos danos mecânicos causados pela colheita, transporte e armazenagem, o que está relacionada à sua perecibilidade (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE; 2001). Tubérculos de espécies amiláceas como mandioca (*Manihot esculenta*), taro (*Colocasia esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e inhame (*Dioscorea spp.*) têm capacidade de aproveitar os eventuais períodos de chuvas e compostos enriquecidos do solo. Esses vegetais lançam mão destes artifícios para sobreviver e transformar seu conteúdo orgânico, modificando suas estruturas moleculares de interação com organismos colaboradores e consumidores (BEZERRA et al., 2002; FAGUNDES et al., 2009).

Análises experimentais dos compostos bioativos presentes em inhames (*Dioscorea spp.*) têm sido descritas ao longo dos anos. CONLAN et al. (1997) isolaram e purificaram parcialmente a dioscorina, principal proteína do inhame *Dioscorea cayennensis*. A massa molecular da proteína solúvel foi determinada (aproximadamente de 31 kDa) e observou-se seis formas isômeras com pontos isoelétricos *pIs* em torno de 5,68 – 6,38. A sequência aminoacídica da proteína é similar à enzima anidrase carbônica, mas seus sítios de ativação são diferentes; testes de imuno localização mostraram que a Dioscorina se acumula principalmente em vacúolos das células vegetais dos tubérculos (LIN et al., 2009).

As características estruturais da dioscorina em diversas espécies do gênero *Dioscorea spp.* foram descritas por vários pesquisadores, em muitas partes do mundo (LU et al., 2012). Pode ser observado que a principal proteína do inhame, a dioscorina, possui modificação molecular e estrutural entre espécies, inclusive relacionada ao solo onde ocorreu seu desenvolvimento. O peso molecular dessa proteína já isolada em diferentes espécies de inhame encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Massa molecular da dioscorina em diferentes espécies de inhames

Gênero e Espécies	Peso Molecular	Pesquisadores
<i>D. cayennensis</i>	31 kDa	Conlan et al., 1997
<i>D. alata</i>	33 kDa	Liao; Tseng; Chen, 2006
<i>D. genus</i>	32 kDa	Pérez et al., 2014
<i>D. esculenta</i>	29 kDa	Prabowo; Estiasih; Purwantiningrum, 2014
<i>D. opposita</i>	32 kDa	Tsulamoto et al., 1984
<i>D. japônica</i>	28 kDa	Xue et al., 2012
<i>D. pseudojaponica</i>	29 kDa	Lin et al., 2009

Modificações moleculares presentes em diferentes espécies de inhame resultam de diferentes condições de cultivo e atividades de substâncias isoladas provenientes dos extratos do inhame. Atividades de proteínas biologicamente ativas como as lectinas, que apresentam pelo menos um domínio não catalítico e capacidade de ligação específica e reversível a mono ou oligossacarídeos, foram relatadas apenas em tubérculos do inhame *D. batatas*. Tais moléculas possuem atividade aglutinante de células sanguíneas como forma de detecção de sua presença em extratos proteicos (LU et al., 2012).

Estudos realizados com tubérculos de *D. opposita* por NAGAI et al. (2005) mostraram que a dioscorina apresentou um elevado efeito antioxidante, com sequestro de espécies reativas de oxigênio para ânions de radicais superóxidos e radicais de hidroxilas. Além disso, essa dioscorina, mostrou uma alta atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA I), sendo esta atividade reportada anteriormente para tubérculos de *D. alata* (TSAI; TAI, 1984).

Estudos sobre ação da dioscorina e de peptídeos ativos de mucilagem em tubérculos de inhames em Taiwan e de outras cultivares chinesas das espécie *D. alata* e *D. batatas*, exercendo atividade inibitória da ECA I, já foram feitos por diversos autores (CHEN et al., 2004; CHANG et al., 2004; HOU et al., 2002; HOU et al., 2001; HUS et al., 2002).

LU et al. (2012), descreveram atividades diversas para a molécula da dioscorina isolada de diferentes espécies de *Dioscorea spp.* (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade biológica nas espécies de inhame *Dioscorea spp.*

Atividade Biológica	Espécies e gênero <i>Dioscorea spp.</i>
α -CAs	<i>D. batatas</i> ; <i>D. alata</i> ; <i>D. pseudojaponica</i>
Anti-hipertensiva	<i>D. alata</i>
Antioxidantes	<i>D. batatas</i>
Imunomodulatória	<i>D. alata</i> ; <i>D. japônica</i>
Atividade Lectínica	<i>D. batatas</i>
Proteção Epitelial - Vias Aéreas	<i>D. batatas</i> ; <i>D. alata</i>

Fonte: LU et al., (2012)

1.4.1 Atividade Anti-Inflamatória

Os diversos compostos presentes no inhame, ao serem absorvidos pelo organismo, atuam sinergicamente promovendo ação anti-inflamatória nos animais. Moléculas vegetais como as antocianinas presentes em tubérculos de *Dioscorea spp*, estão envolvidas no processo de defesa imunológica do consumidor destes alimentos, visto que além de ação anti-inflamatória, apresentam elevados índices de atividade antioxidante (BOUIC, 2001; CAMBIE; FERGUSON, 2003; SUBARNAS; WAGNER, 2000; OSZMIANSKI, 2001).

Segundo SHANG et al. (2004), em ensaios realizados *in vivo* administrando dioscorina de tubérculos de *D. alata* por via oral durante de 21 dias, verificaram, através da análise das fezes dos animais, que houve aumento das Placas de Peyer e secreção de IgA. O que resultava do aumento na resposta imune da mucosa intestinal, onde em prática a molécula contribuía para tal ação, assim pode ser usada para expulsar patógenos invasores e comensais.

1.4.2 Atividade Antifúngica

As plantas medicinais e os vegetais que compõem a dieta das populações possuem uma grande riqueza química em princípios ativos microbicidas. São fontes potenciais de biomoléculas ativas e podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos e na estimulação da atividade imune contra predadores (RODRIGUES et al., 2006). Esses compostos bioativos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, tais como: alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, saponinas, entre outras (DI STASI; 1996).

A diversidade de substâncias bioativas das plantas estimula a execução de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais naturais no intuito de explorar suas propriedades bactericidas e fungicidas (FRANZENER; 2003).

Um dos principais problemas na prestação dos serviços de saúde são as infecções hospitalares causadas por fungos. Segundo informações do Sistema Nacional de Vigilância das Infecções Hospitalares dos Estados Unidos, a prevalência destas infecções fúngicas passou de 6% em 1980 para 10,4% em 1990. Cerca de 80% dessas infecções foram causadas por leveduras do gênero *Candida sp* (MEDRANO et al., 2006). São conhecidas 200 espécies de *Candida sp*. Destas, 10% estão associadas a infecções em humanos; sendo *C. albicans* a principal espécie envolvida na maioria dos casos de infecção hospitalar, embora espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* também sejam descritas como envolvidas (MALUCHE; SANTOS, 2008).

Algumas proteínas extraídas e purificadas de tubérculos já tiveram sua atividade inibitória ao crescimento de fungos relatada. Dessa maneira, a tarocistatina, fitocistatina presente nos tubérculos do taro (*Colocasia esculenta*), apresentou atividade antifúngica causando efeito tóxico ao crescimento do micélio do fungo fitopatogênico *Sclerotium rofsii* Sacc. A referida molécula também demonstrou capacidade de bloquear a cisteína protease endógena do micélio fúngico (YANG; YEH, 2005).

1.4.3 Atividade Antitumoral

Atualmente, os compostos naturais bioativos são utilizados em suplementos alimentares e fármacos no intuito de reduzir os efeitos da exposição aos radicais livres e prevenir o estresse oxidativo advindo do ambiente e outros fatores externos. Dentre os compostos químicos envolvidos em atividades antioxidantes e anticâncer, tem merecido atenção os triterpenos, saponinas esteroidais, flavonoides, entre outros (BERHOW, et al., 2000; KERWIN, 2004).

Experimentos realizados com a dioscorina extraída de tubérculos de *D. alata*, apontaram o potencial dessa proteína na inibição do crescimento de células tumorais (crânio humano), como também sua citotoxicidade, uma vez que essa molécula induzia a apoptose em células com desordem tumoral. A análise fitoquímica dos componentes anticancerígenos presentes no extrato revelou, ainda, sua propriedade antioxidante, com elevada ação contra os radicais livres (DAS ABHISHEK et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo teve como objetivo geral isolar e caracterizar bioquimicamente a fração proteica dioscorina (FPD) em tubérculos de *Dioscorea cayennensis* e bioprospectar quanto à presença de compostos antinutricionais e atividades biológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar bioquimicamente a FPD em tubérculos de *Dioscorea cayennensis*;
- Determinar a massa molecular das proteínas que constituem a fração;
- Verificar a presença de compostos antinutricionais (lectinas e inibidores de tripsina);
- Analisar a composição de aminoácidos do FPD;
- Determinar o potencial antioxidante frente ao sequestro de radicais (ABTS e DPPH);
- Avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica;

**Obtenção da Fração Proteica Dioscorina de Inhame (*Dioscorea cayennensis*):
Caracterização Bioquímica e Atividades Biológicas**

Aleson Pereira de Sousa¹, Edilza Silva do Nascimento², Samara Batista Montenegro², Marta Suely Madruga³, Edeltrudes de Oliveira Lima⁴, Daniele Figueredo Silva⁴, Tatiane Santi Gadelha² & Carlos Alberto de Almeida Gadelha²

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba (aleson_155@hotmail.com)

² Laboratório de Protômica Estrutural – Departamento de Biologia Molecular (autor para correspondência (calbgadelha@gmail.com))

³ Centro de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba

⁴ Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal da Paraíba

* Artigo submetido a revista: *Intenational Journal of Biological Macromolecules*

1. Introdução

Os nutrientes são substâncias químicas presentes em alimentos, necessários à vida; possuem funções cruciais as células que constituem os organismos, tais como crescimento, manutenção e reparo celular (STIPANUK; CAUDILL, 2013). Atualmente, os estudos relevantes, relacionam o consumo de alimentos com propriedades nutricionais que contribuam para a saúde, com a ingestão/absorção de compostos bioativos, tais como proteínas, vitaminas e minerais. Entretanto, algumas moléculas presentes nestes alimentos também podem apresentar substâncias consideradas antinutritivas e/ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, saponinas, inibidores de proteases e lectinas (SILVA et al., 2010; PUSZTAI et al., 1997; ARMOUR et al., 1998).

Além do interesse do ponto de vista nutricional, tais biomoléculas supracitadas têm sido bastante exploradas devido ao seu potencial em aplicações biotecnológicas envolvendo as áreas de agropecuária, nutrição, saúde e produtos químicos industriais. Particularmente, o cultivo de raízes e tubérculos alimentares como batata (*Solanum tuberosum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*) e inhame (*Dioscorea spp.*) são de grande importância alimentar em países localizados nos trópicos úmidos e subúmidos onde não há grande produção de cereais (ZANONLL, 2009; DIOP; CALVERLEY, 1998).

Rizomas e tubérculos são geralmente ricos em carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e ácidos orgânicos. Entre as vitaminas cita-se principalmente a tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e a vitamina C. Possuem ainda antocianinas, fitosteróis, glicolipídios, antioxidantes, além de apresentar baixo conteúdo lipídico, sendo considerado como fonte alimentar ideal para crianças e celíacos (RAMOS; RAMOS; HIANE, 1997).

A ampla variedade do consumo de tubérculos, com destaque para o consumo do inhame na região nordeste do Brasil, torna essencial sua melhor caracterização nutricional, toxicológica e bioquímica, bem como os compostos bioativos oriundos deste tubérculo.

Análises experimentais da dioscorina, principal proteína presente em diversas variedades de inhames (*Dioscorea spp.*) tem sido realizada ao longo dos anos por diversos pesquisadores; nestas, testes de imunolocalização mostraram que a dioscorina se acumula, principalmente, em vacúolos das células vegetais dos tubérculos (CONLAN et al., 1997).

Bioquimicamente, a dioscorina de diversas espécies do gênero *Dioscorea spp.* apresenta modificações moleculares e estruturais, tanto a nível de espécies e variedades como, também, devido ao desenvolvimento em diferentes solos (LU et al., 2012). Apesar disso, até o momento,

em algumas espécies desse tubérculo, são escassas as informações acerca de possíveis funções biológicas associada a esse concentrado de proteínas.

O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar bioquimicamente a fração proteica dioscorina (FPD) presente em tubérculos de *Dioscorea cayennensis* e bioprospectar a referida fração quanto à presença de compostos nutricionais/antinutricionais e atividades biológicas: antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

2. Metodologia

2.1. Materiais

Os tubérculos do inhame *D. cayennensis*, foram adquiridos da estação experimental do campus UFPB/Areia. Os radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid), (Trolox) 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid, enzima tripsina bovina, DL-BAPNA (DLbenzoil-arginina-paranitroanilida e resarzurina sódica foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, EUA). O marcador de peso molecular foi adquirido da GE Heatchcare. Os solventes e demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

2.2. Separação da Mucilagem e Extração de Proteínas

Os tubérculos, previamente higienizados, passaram pelo processo de separação da mucilagem e obtenção da farinha ultrafina (FU), conforme descrito por Guerreiro (2002) com ligeiras adaptações, descritas na Fig. 1. A farinha ultrafina foi submetida a extração proteica sob agitação constante durante 3 horas em solução tampão: Tris HCl 0,05M pH 8,3 na proporção de 1:10 (p/v) e, ao término do tempo, o extrato resultante foi centrifugado a 5000rpm. O sobrenadante obtido (extrato total solúvel - ET) foi filtrado em filtro qualitativo e conservado em refrigeração. A Figura 1 ilustra o fluxograma das operações realizadas para a obtenção da farinha ultrafina separada da mucilagem de inhame e extração de proteínas presentes nos tubérculos.

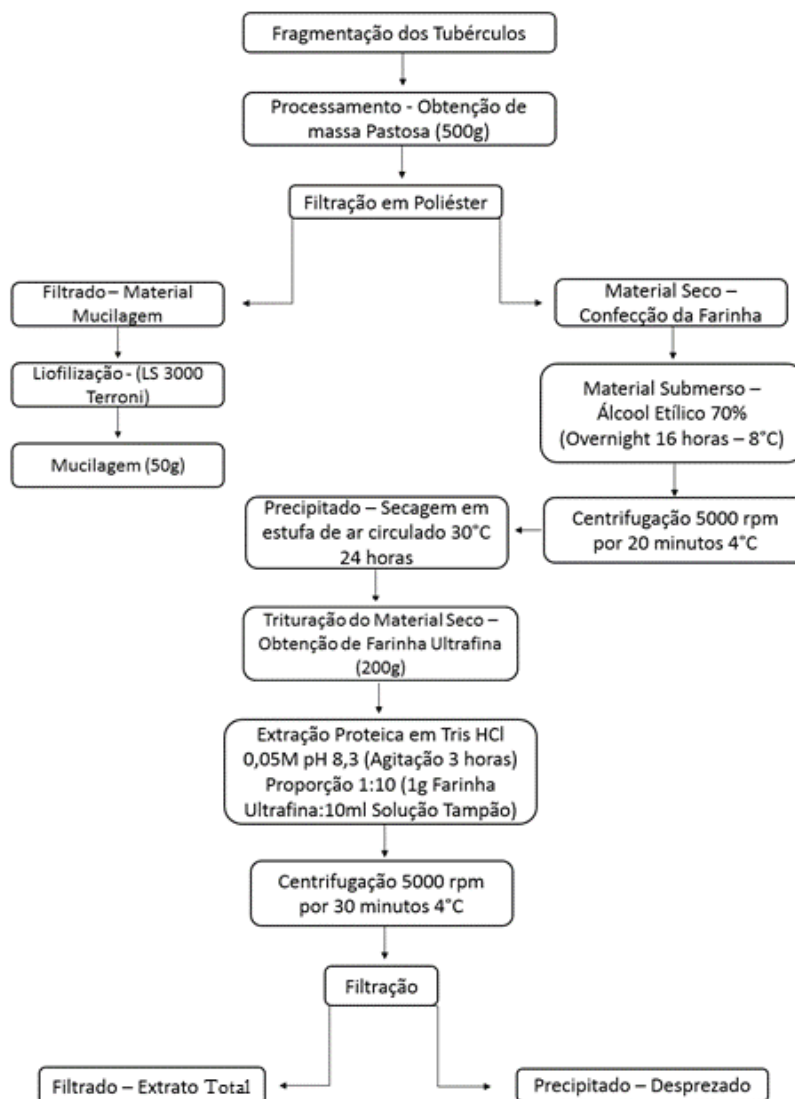
2.3. Precipitação de Proteínas – Salting Out

A precipitação proteica do extrato total solúvel foi feita conforme Lin et al., (2009) utilizando o sulfato de amônio para obtenção da fração 45 – 75% (F₄₅₋₇₅), feita overnight durante

18 horas em ambiente refrigerado a 8°C. Em seguida, houve a centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos a 4 °C, sendo o precipitado obtido (120mL – precipitado/2L de Extrato) acumulado para uso nos experimentos seguintes.

Este material foi dialisado em sacos porosos com limite de exclusão molecular de 8 kDa contra água destilada na proporção de 1:10 (p/v). Após diálise, a amostra foi liofilizada e estocada em temperatura de 4°C para as análises posteriores. O material liofilizado foi denominado Fração Protéica Dioscorina (FPD).

Figura 1. Fluxograma para obtenção da farinha ultrafina (FU)



Fonte: Adaptado de Guerreiro (2002)

2.4. Determinação de Proteínas Solúveis

A concentração de proteínas solúveis presentes no ET, foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para isso, as amostras (100 μ L), adicionadas de 2,5 mL do reagente de Bradford (Bioagency), foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3$). A concentração de proteínas foi determinada por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 595 nm.

2.5. Análise Fitoquímica

O ET e FPD foram fitoquimicamente caracterizados para determinar as classes de compostos existentes no material biológico em estudo, de acordo com Ayoola et al., (2008) com algumas adaptações.

Para cada um dos metabólitos secundários e demais constituintes analisados foram utilizadas técnicas específicas como: saponinas (teste de espuma-agitação); taninos (reação com cloreto férrico/acetato de chumbo/gelatina); antocianinas, antocianidinas e flavonóides (teste de variação do pH/aquecimento); catequinas (reação com ácido clorídrico/aquecimento), flavonóis e xantonas (reação com magnésio granulado/ácido clorídrico/aquecimento). A presença ou ausência destes fitoconstituintes no estudo foi verificada qualitativamente a partir da observação da reação característica esperada ou não.

2.6. Determinação da Massa Molecular – Eletroforese SDS-PAGE

O perfil de proteínas presentes na fração foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, conforme metodologia de Laemmli (1970), adaptada para o uso em placas. O ET e FPD foram solubilizadas em tampão de amostra Tris-HCl 0,625M, pH 6,7, contendo azul de bromofenol a 1%, SDS 10%, glicerol e β -mercaptoetanol 5%. Em seguida, as amostras foram aquecidas em estufa a 100°C durante 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos e, por fim, 50 μ L de cada amostra foram aplicados em poços presente no gel.

O gel de separação foi feito com solução de 15% de acrilamida e bis-acrilamida e o gel de empilhamento com solução 3,5%. O gel de poliacrilamida foi montado em cuba vertical de eletroforese com tampão de migração eletroforética para passagem de corrente elétrica. A determinação da massa molecular das proteínas foi feita através da comparação das bandas

presentes em marcador de peso molecular comercial (Full Range Molecular Weight Marker – GE Healthcare) com massas moleculares na faixa de 9 a 200 kDa. A corrida obedeceu a amperagem constante de 50 mA durante duas horas. Ao término da corrida, o gel foi fixado em TCA 12,5% por uma hora, corado com solução contendo 0,25% de Comassie Blue R-250 em ácido acético/metanol/água (1:4:5). Para revelação, foi utilizado a solução descorante contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético.

2.7. Determinação da massa molecular por espectrometria de massas (MALDI-ToF)

As massas moleculares das proteínas presentes no FPD foram determinadas na faixa de 20 a 70 kDa por espectrometria de massas usando a técnica MALDI-ToF em equipamento UltrafleXreme – Bruker Laser Nd: YAG, 355nm, Freq. laser: 100Hz Programa: FlexControl. Versão 3.0 (Bruker Daltonics). Na obtenção dos espectros de massas, as amostras foram solubilizadas em água e adicionadas na placa de MALDI em igual proporção com 0,5 µl de matriz 1 alfa-ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico – HCCA (10 mg/mL) em acetonitrila P. A. 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,3%. A partir dos espectros de massa obtidos pela técnica, o Peptide Mass Fingerprint (PMF) foi gerado para a amostra da proteína através de comparação com os espectros de massas já descritos para a dioscorina por outros autores em espécies distintas de inhame.

2.8. Composição de Aminoácidos

A composição aminoacídica foi realizada de acordo com o método descrito por White, Hart, Fry (1986), onde os teores de aminoácidos foram determinados em amostras previamente hidrolisadas com ácido clorídrico bidestilado 6N, seguido de derivação em pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil –aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção de 20µL da amostra foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1mL/min, à temperatura de 35°C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 21 minutos. A curva de calibração foi construída com sete pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção de 20µL da solução de aminoácido preparada numa

faixa de 0,1875 $\mu\text{mol/mL}$ a 0,25 $\mu\text{mol/mL}$. Em cada curva de calibração, o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método.

2.9. Detecção de Compostos Antinutricionais

2.9.1 Atividade Lectínica

No ensaio para detecção da atividade hemaglutinante conforme Moreira, Oliveira (1983), foi utilizado uma suspensão de hemácias de coelho (previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba sob protocolo de número 082/2015). O preparo de alíquotas com 3 mL de sangue em 7 mL de solução NaCl 0,15M. As hemácias foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, material contendo soro e hemácias hemolisadas, este processo foi repetido 5 vezes para cada alíquota. Para verificar a dependência por cátions divalentes das proteínas presentes nos extratos, foram feitas diluições do mesmo em solução NaCl 0,15M contendo íons (Ca^+ , Zn^+ e Mn^+). Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante 30 minutos, sendo a atividade hemaglutinante determinada macroscopicamente através da visualização da aglutinação das hemácias pelos extratos testados.

2.9.2 Atividade anti-trípica

Para determinar o potencial dos compostos presentes nos extratos à atividade anti-trípica o ensaio foi realizado de acordo com Xavier-Filho et al., (1989). As amostras foram submetidas a ensaios para determinação do percentual de inibição da atividade enzimática da enzima proteinase Tripsina. A mistura de pré-incubação, com volume final de 1,2 mL, foi constituída de 365 μL de tampão Tris/HCl 0,05 M pH 7,5, 15 μL de tripsina bovina Sigma (0,3 mg/mL da enzima dissolvida em HCl 1mM,), 120 μL de HCl 0,0025M e 100 μL dos extratos totais das amostras consideradas no estudo. Transcorrido o tempo de pré-incubação, à mistura foi acrescida de 500 μL do substrato cromogênio DL-BAPNA 0,5 mM (DLbenzoil-arginina-paranitroanilida, Sigma) e incubada durante 15 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 120 μL ácido acético a 30% (v/v) e a hidrólise do substrato ocasionado pela enzima foi medido em espectrofotômetro a 410 nm (XAVIER-FILHO et al., 1989). O cálculo da

atividade inibitória foi obtido a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio, de acordo com (ERLANGE; KOLOWSKY; COHEN, 1961).

2.10 Atividade Antioxidante

2.10.1 Sequestro do radical ABTS^{•+}

Foi realizado o teste para determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-(3etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) segundo Pellegrini et al., (1999). Alíquota de 100 µL das amostras nas respectivas concentrações proteicas: ET (21, 42 e 62 µg/mL) e FPD (23, 47 e 70 µg/mL) foi adicionada em 3 mL de solução ABTS (em água). A mistura resultante foi homogeneizada por 6 minutos na ausência de luz seguido de determinação da absorbância em 734 nm. Os resultados foram expressos como percentual de ação antioxidante de ET e FPD. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o Trolox 1000 µM.

2.10.2 Sequestro do radical DPPH

A capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), pelos extratos testados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Morales, Jimenez-Perez (2001), com algumas adaptações. Em 3 mL de solução DPPH (em etanol absoluto) foi adicionado 100 µL das amostras nas respectivas concentrações proteicas: ET (21, 42 e 62 µg/mL) e FPD (23, 47 e 70 µg/mL). A mistura resultante foi homogeneizada por 80 minutos a em constante agitação com abstenção de luz. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 14000 rpm e suas absorbâncias foram espectrofotometricamente determinadas à 517 nm. Os resultados foram expressos como percentual de ação antioxidante no ET e FPD comparado ao controle positivo (Trolox 1000 µM). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.11 Atividade Antibacteriana e Antifúngica

2.11.1 Culturas microbianas

As amostras ET e FPD foram devidamente solubilizadas em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foram completadas com água

destilada esterilizada (q.s.p. 3mL) para obtenção uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL (CLELAND; 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos, foram utilizadas as seguintes cepas:

-Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. aureus* ATCC- 13150, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853 e *P. aeruginosa* ATCC-9027, *Salmonella spp* ATCC 1408, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922,

-Leveduras: *Candida albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-108, *Candida tropicalis* ATCC -13803, *C. tropicalis* LM-64,

-Fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* LM-247, *A. flavus* LM-714.

As cepas foram mantidas em BHI e ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios repiques de 24-48 horas em ASD/BHI, incubados a 35 ± 2 °C. Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos mantidas em BHI/ASD/, foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland para obtenção de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

2.11.2 Avaliação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleland; Squires (1991). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas fúngicas e bacterianas foi feita através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços. O ensaio foi realizado em duplicata e incubado a 35 ± 2 °C durante 24-48 h (bactérias e leveduras) e a temperatura ambiente/7dias (fungos filamentosos). No ensaio com espécies bacterianas, após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina sódica (Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido- redução para bactérias. Em paralelo, 20 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% (Sigma-Aldrich®), um indicador calorimétrico de óxido-redução para leveduras foi adicionado (DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE et al., 2005).

As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C durante 24-48 h. A leitura dos ensaios para avaliar o crescimento do micro-organismo foi procedida por visualização da mudança de coloração nas cavidades de azul - rosa, nos ensaios com bactérias, e de incolor para rosa nos ensaios com leveduras. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração

capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador de crescimento.

A atividade antimicrobiana das amostras foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2004).

2.12 Testes estatísticos

Os testes estatísticos foram feitos com *t*- Student, onde $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). Para realização da análise foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3 Resultados e Discussão

3.1 Extração Proteica e Obtenção da FPD

Devido à presença de elevados teores de carboidratos, a amostra necessitou de um processamento complexo com etapas de separação/precipitação (Fig. 1) para obtenção de um material rico em proteínas, conforme (GUERREIRO, 2002). Os interferentes presentes na mucilagem do inhame representaram cerca de 60% da composição do tubérculo. A massa inicial teve rendimento de 40% da FU, utilizada na realização de extração proteica para fins de obtenção da FPD.

Na Tabela 1, constata-se variações significativas nos teores de proteínas entre as condições utilizadas de solubilização das proteínas do FPD. Foi determinado a melhor forma de solubilidade para as condições ótimas necessárias para as atividades seguintes.

Tabela 1. Teores de proteínas solúveis do Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina

Material	Solução Tampão / Solubilização	mg/mL
ET	Tris 0,05M pH (8,3)	0,694
FPD	Tris 0,05M pH (8,3)	0,365
FPD	Glicina NaOH 0,02M pH (9,5)	0,413
FPD	Bicarbonato de Amônio 0,05M	0,402

Assim, foi utilizado nos experimentos a solução tampão Glicina NaOH 0,02M pH (9,5) para solubilização do FPD, uma vez que apresentou maior concentração de proteínas solúveis 0,413 mg/mL. Considerando a forma de obtenção do FPD e o teor de proteínas solúveis, os resultados obtidos são condizentes com aqueles relatados em estudos anteriores com outras espécies (CONLAN et al., 1997; LU et al., 2012; HSU et al., 2002; LIAO et al., 2006). Os estudos realizados em tubérculos de mandioca (*Manihot esculenta*) e batata inglesa (*Solanum tuberosum*) mostraram que soluções tampão na faixa de pH alcalino possuem maior capacidade de extração de proteínas e que, a faixa de precipitação salina permite a obtenção de maiores quantidades de proteínas está entre 30 a 90% (KUZNETSOV; RADYUKINA; SHEVYAKOVA, 2006). Contudo, ressaltam que a solubilização das frações proteicas obtidas varia, dependendo do tipo de solução tampão utilizada.

3.2 Isolamento da FPD

As etapas de isolamento para obtenção da FPD encontram-se resumidas na Tabela 2. Nesta, constata-se que as etapas utilizadas permitiram um rendimento de 16% em comparação com o produto inicial FU. Para obtenção de um 1 mg de amostra liofilizada da FPD, foi necessário a repetição do método cerca de 6,5 vezes. Tal resultado está em consonância com aqueles anteriormente utilizados para o isolamento da FPD por Conlan et al., (1997), bem como por Lu et al., (2012) e Liao et al., (2006), que obtiveram o isolamento da mesma fração proteica de outras espécies do mesmo gênero, sempre no intuito de avaliar o potencial biológico e nutricional dos isolados. No entanto, o uso de tampões com pH diferentes para solubilização das proteínas resultam em composição distintas de proteínas na fração solúvel.

Tabela 2. Etapas de isolamento da Fração Proteica Dioscorina

Etapa	Total de Proteínas (mg/mL)^A	Veze de Isolamento^B	Recuperação (%)^C
FU	2,6	-	100
ET	0,694	3,8	27
FPD	0,413	6,5	16

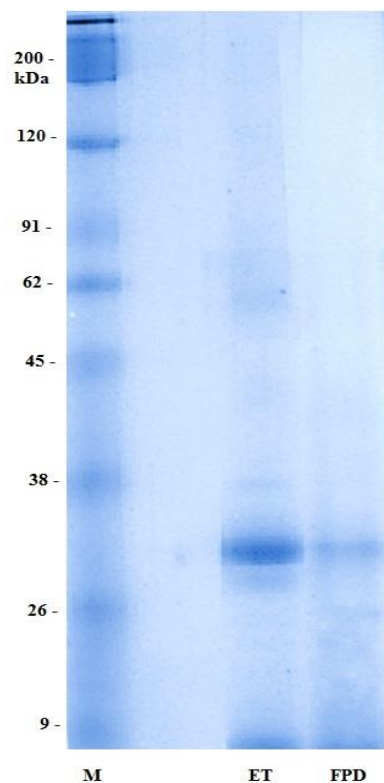
^A Miligramas de proteínas solúveis por mililitro;

^B Repetição do método para o isolado alcançar 1mg de amostra liofilizada;

^C Rendimento (relacionado ao isolamento de proteínas mg/mL).

Tanto ET, como FPD de tubérculos de *D. cayennensis*, tiveram seus perfis eletroforéticos proteicos determinados por PAGE-SDS em condições redutoras, ou seja, em presença de ditioneitol (DTT), (Fig 2). Os resultados demonstraram que o ET apresenta bandas com massa molecular na faixa de 9 a 91 kDa, com presença da banda proteica característica da dioscorina; que conforme estudos realizados com outras espécies deste gênero, encontra-se na faixa de 28-33 kDa (CONLAN et al., 1997; LIAO et al., 2006). Através da análise do padrão de bandas proteicas da FPD, constata-se que o fracionamento proteico permitiu a eliminação da maior parte dos interferentes. Na comparação do perfil eletroforético do FDP com o de proteínas de massa molecular conhecido adicionadas ao mesmo gel, foi possível constatar a existência de uma banda com massa molecular de aproximadamente 28 kDa. Também foi verificada a uma outra banda de baixa massa molecular, na fração proteica isolada.

Fig 2. Padrão eletroforético de ET e FPD em PAGE-SDS 15%. **(M)** Marcador de massa molecular. **(ET)** Extrato Total Tris 0,05 M pH 8,3. **(FPD)** Fração protéica da Dioscorina - 45-75% sulfato de amônio.

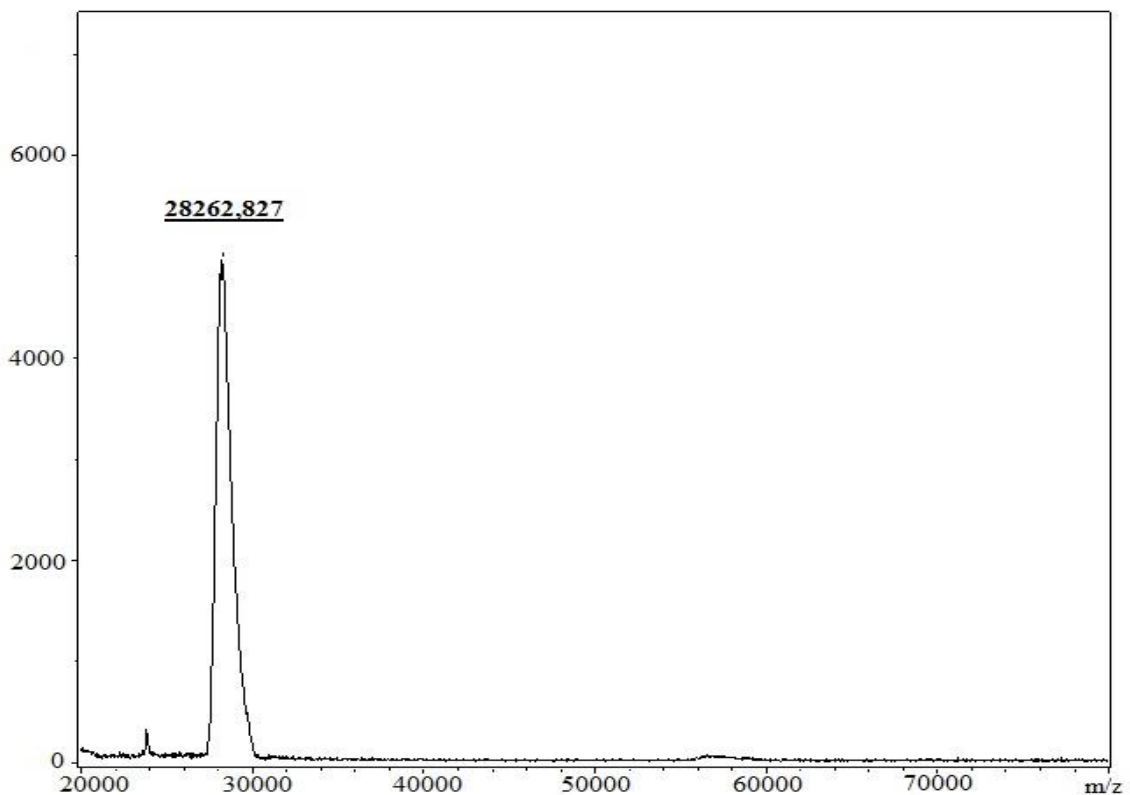


Quando analisada, através da técnica de espectrometria de massas por MALDI-ToF, a FDP gerou um pico único na faixa analisada de 20.000 – 70.000 m/z (Fig 3). O pico, com massa

relativa de 28.262,827 Da, corrobora com os resultados de SDS-PAGE (Fig2), onde a FPD apresentou-se como uma banda de massa molecular de aproximadamente 28 kDa. (LIAO et al., 2006), também por espectrometria de massas, determinaram a massa molecular da Dioscorina do inhame *D. alata* como sendo de 33 kDa.

Estudos já realizados com a mesma espécie e diferentes espécies do mesmo gênero *Dioscorea spp.*, evidenciaram que as dioscorinas isoladas de tubérculos podem apresentar diferentes massas moleculares. Assim, (CONLAN et al., 1997) isolaram em *D. cayennensis* uma dioscorina com massa molecular de 31 kDa. Já, em estudo recente, (XUE et al., 2012) isolaram uma dioscorina de *D. japonica* com massa molecular de 28 kDa. Em nosso trabalho, foi detectado na FPD, extraída de tubérculos de *D. cayennensis*, a presença de uma dioscorina com massa molecular de 28 kDa. Tal resultado difere daquele encontrado por Conlan et al. (1997), que obtiveram, empregando a mesma metodologia, uma dioscorina de maior massa molecular (31 kDa).

Fig 3. Padrão de Espectrometria de Massas MALDI-ToF realizado no Fração Proteica Dioscorina



É bem conhecido na literatura que tubérculos de espécies amiláceas, como é o caso de *D. cayennensis*, por serem estruturas de reserva, podem se aproveitar de variações edafoclimáticas para sobreviver e transformar seu conteúdo orgânico, modificando as estruturas de suas moléculas (ZANONLL, 2009; DIOP; CALVERLEY, 1998). Tal fato explicaria o motivo da dioscorina obtida de tubérculos de *D. cayennensis*, sob a mesma metodologia, apresentar uma diferença de massa molecular de 3kDa em relação àquela anteriormente descrita por [8].

Pesquisas relacionadas com proteínas vegetais relatam que tais moléculas costumam oligomerizar sua estrutura monomérica em estruturas mais complexas, formando dímeros, trímeros e tetrâmeros que são diferenciados e estimados nas suas estruturas nativa/reduzida [38]. A massa molecular do FPD, sua forma reduzida, apresentada por SDS-PAGE e por espectrometria de massas MALDI-ToF é condizente como observado em outros estudos (CONLAN et al., 1997; LIAO et al., 2006; XUE et al., 2012).

3.3 Caracterização Fitoquímica

A aplicação de métodos qualitativos na prospecção fitoquímica é relevante por possibilitar o screening inicial de mais baixo custo (AYOOLA et al., 2008). Alguns constituintes presentes em extratos vegetais podem apresentar atividades biológicas específicas, como é o caso das saponinas (atividade hemolítica, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica e antitumoral) (SPARG; LIGHAT; VAN STADEN, 2004); catequinas, flavonas, flavonóis, xantonas, antocianinas, antocianidinas e flavonoides (antioxidantes, antitumoral e anti-inflamatória) (ROCHA et al., 2011); taninos (antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, regeneração tecidual e ativação de resposta imune) (MAGALHÃES, 2004).

Nos resultados obtidos para o perfil fitoquímico determinado a partir do ET e FPD, foi possível constatar grupos de compostos químicos provenientes do do ET, bem como, a ausência desses interferentes químicos na FPD, demonstrando que o fracionamento foi eficiente para eliminação dos compostos avaliados, Tabela 3.

Entre os compostos químicos avaliados no ET, observou-se a presença de taninos, saponinas, flavonas, flavonóis e xantonas. Tal resultado, condiz com aquele relatado por (MAGALHÃES, 2004), que em extratos de folhas de *D. alata*, encontrou grande quantidade de saponinas e esteroides livres. Este estudo também destacou a presença de atividade

antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus*, embora não se tenha estabelecido sua relação com a presença dos fitoquímicos encontrados.

Tabela 3. Caracterização Fitoquímica do Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina

Classes	Reações	Presença	
		ET	FPD
Taninos	<i>Gelatina</i>	+	-
	<i>Sais de Ferro</i>	-	-
	<i>Acetato de Chumbo</i>	-	-
Saponinas	<i>Espuma</i>	+	-
Catequinas	<i>Cor (amarelo-pardo)</i>	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	<i>Cor (amarelo-laranja)</i>	+	-
Antocianinas, Antocianidinas e flavonoides	<i>Cor (vermelho-púrpura)</i>	-	-

(+) Reação positiva, (-) Reação negativa

3.4 Avaliação de Fatores Antinutricionais Proteicos

Nos resultados da determinação da presença de fatores antinutricionais de natureza proteica no ET e FPD obtidos de tubérculos de *D. cayennensis*. Constatou-se que, para o ET, a atividade lectínica foi fraca e encontrada apenas para a amostra em presença do íon divalente cálcio. Da mesma forma que para a presença de lectinas, baixa atividade foi observada no ET no ensaio de atividade anti-tríptica (8%). Para a FPD, a presença dos fatores antinutricionais avaliados não foi detectada, Tabela 4.

Tabela 4. Determinação da presença de compostos antinutricionais proteicos no Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina

Amostra	Atividade Lectínica				Atividade Anti-tríptica %
	Normal	(Ca ²⁺)	(Zn ²⁺)	(Mn ²⁺)	
ET	-	+/-	-	-	8
FPD	-	-	-	-	-

(+/-) Reação fraca, (-) Reação negativa

De maneira oposta, (CHAN; NG, 2013) na pesquisa com tubérculos de *D. opposita*, detectaram a presença de atividade lectínica ao longo de todos os passos de purificação. A lectina isolada por esses autores demonstrou atividade antitumoral frente a linhagens de células de hepatoma, câncer de mama e carcinoma nasofaríngeo. Gaidasmashvili et al., (2004), estudando genótipos de *D. batata*, observaram que lectinas e inibidores de tripsina nem sempre estavam presentes nos diferentes genótipos testados.

Provalvemente a baixa atividade lectínica encontrada no ET seja devido a presença de metabólitos secundários, uma vez que, em sua caracterização fitoquímica (Tabela 3), foi detectada a presença de taninos. Estes compostos em extratos foliares geram reações falso positivo para inibidores de proteases e lectinas. Em folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) foi demonstrado o potencial tóxico *in vivo*, presentes nos metabólitos secundários e componentes antinutricionais (TEO et al., 2010; CEREDA; LOPES, 2003).

3.5 Atividade Antioxidante

Os resultados de atividade antioxidante do ET e FDP evidenciaram que tanto o ET como a FDP de tubérculos de *D. cayennensis* apresentaram considerável atividade antioxidante, (Fig 4). Para o ET foram constatados valores significativamente crescentes de atividade antioxidante em relação ao controle positivo (C+), com 39, 64 e 72%, quando considerada a atividade de captura do radical ABTS (Fig.4 A) e, 7, 20 e 22% para a atividade de captura do radical DPPH (Fig.4 B), para as crescentes concentrações analisadas de 21 42 e 62 µg/mL, respectivamente. A partir da obtenção da FPD, verifica-se a permanência da atividade antioxidante com valores crescentes, dependentes das concentrações proteicas testadas. Neste caso, foram obtidos valores de 53, 67, 83% para a atividade de captura do radical ABTS, e de 17, 30, 32% e do radical DPPH, em concentrações analisadas de 23. 47 e 70 µg/mL, respectivamente.

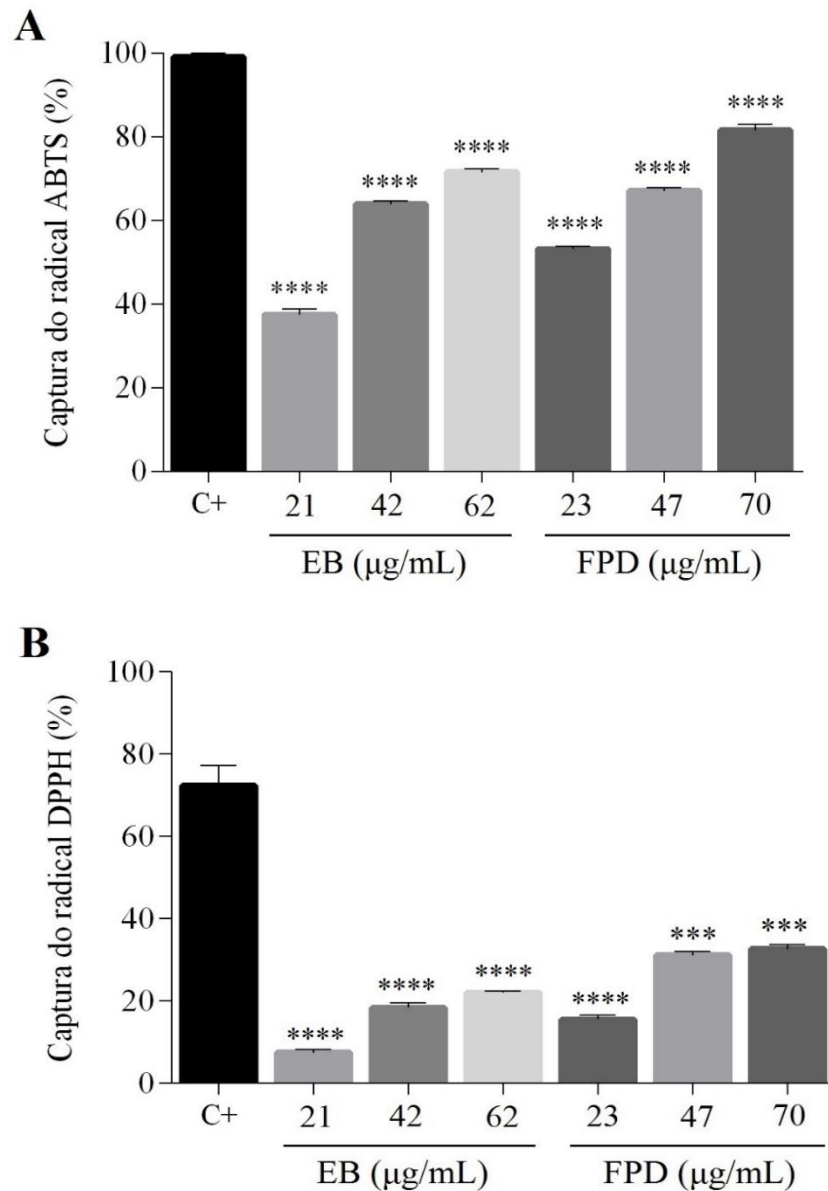


Fig. 4. Atividade antioxidante de Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina. **(A)** Captura do radical ABTS. **(B)** Captura do radical DPPH. No ensaio o Trolox foi utilizado como controle positivo. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram detectadas pelo teste *t* student não-pareado, sendo considerado $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) como estatisticamente significativos em comparação com o controle positivo Trolox.

Os radicais livres são estruturas químicas instáveis e reativas, que se tornam estáveis, quando reagem com compostos químicos antioxidantes. O fluxo fisiológico normal das células produz radicais livres/agentes oxidantes. Por outro lado, a ingestão de alimentos traz agentes antioxidantes que contrabalaçam o fluxo de produção de oxidantes durante as atividades do corpo (ALVES et al., 2010). Embora as vitaminas sejam os nutrientes com maior potencial

antioxidante, no grupo dos metabólitos secundários, também merecem destaque os compostos fenólicos. Além do alto teor nutritivo, legumes, hortaliças, frutas, dentre outros vegetais, são ricos em compostos antioxidantes, isto ocorre devido à presença de proteínas bioativas e compostos fenólicos (KANATT et al., 2011; BECANA et al., 2010).

A menor atividade antioxidante verificada no ET em relação a FPD, em todas as concentrações testadas, está de acordo com os resultados previamente reportados (LU et al., 2012; HOU et al., 2001; NAGAI et al., 2005). Assim, isolados ou frações proteicas propiciam maior interação de seus componentes estruturais no processo de ligação aos radicais, exibindo melhor performance nas avaliações de atividade antioxidante; tal condição já foi relatada para a Dioscorina de uma outra espécie de inhame (JHENG et al., 2012).

Já foi descrito que a atividade antioxidante pode ser dependente não apenas nas proteínas presentes em extratos e frações e/ou de suas interações, mas também da presença de peptídeos ou compostos fenólicos. Conforme foi constatado, os compostos fenólicos presentes no ET foram eliminados durante o processo de obtenção da FPD (Tabela 3) logo, a atividade antioxidante encontrada na FDP pode ser atribuída a dioscorina, bem como ao peptídeo detectado por SDS-PAGE. A composição de aminoácidos encontrada na FPD pode contribuir consideravelmente para a atividade antioxidante apresentada nos testes. Proteínas de origem vegetal são capazes de inibir a oxidação e inativar espécies reativas de oxigênio, entre outros radicais livres (HALLIWELL, 1990). Agentes oxidantes podem reagir com resíduos de metionina, que estão expostos na superfície da proteína, sendo um captador de radicais oxidantes. Apesar do mecanismo dessa função biológica não ser completamente esclarecido (LEVINE et al., 1996).

3.6 Composição de Aminoácidos

Na composição de aminoácidos da FPD constatou-se que os aminoácidos presentes em maior conteúdo são: arginina (Arg), ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp) com 226,50, 97,12 e 89,97mg/g de proteína, respectivamente (Tabela 5). Tais aminoácidos se destacam na composição das proteínas de origem vegetal, pela capacidade de captar e armazenar nitrogênio em proteínas de reserva presentes em sementes e tubérculos (POLANCO-LUGO et al., 2014).

A FPD, obtida de *D. cayennensis*, por ser um isolado proteico de tubérculos, apresentou elevado teor destes aminoácidos (Glu e Asp); contudo estes valores corresponderam a metade dos teores relatados por (MEGIAS et al., 2008), que encontraram teores de Glu e Asp de 229 e 98 mg/g na composição das proteínas vegetais de reserva de nitrogênio.

Estudos realizados por (SARMADI; ISMAIL, 2010; SAMARANAYAKA et al., 2011), descreveram o mecanismo de ação dos aminoácidos na promoção de atividades antioxidantes. Segundo esses autores, as cadeias laterais de alguns aminoácidos são capazes de doar prótons ou elétrons aos radicais livres. Assim, aminoácidos ácidos e básicos, por possuírem nas cadeias laterais grupos carboxila e aminícos, atuam como agentes estabilizadores.

Tabela 5. Composição de aminoácidos totais (mg/g de proteína) da Fração Proteica Dioscorina

Aminoácidos totais (mg/g de proteína)	Símbolo	FPD
Ácido aspártico	Asp	89,97 ± 0,01
Ácido glutâmico	Glu	97,12 ± 0,14
Serina	Ser	58,68 ± 0,24
Glicina	Gly	46,80 ± 0,07
Histidina	His	49,97 ± 0,08
Arginina	Arg	226,50 ± 0,06
Treonina	Thr	26,99 ± 0,08
Alanina	Ala	54,77 ± 0,04
Prolina	Pro	32,91 ± 0,05
Tirosina	Tyr	62,09 ± 0,21
Valina	Val	29,54 ± 0,09
Metionina	Met	27,81 ± 0,01
Isoleucina	Ile	28,80 ± 0,01
Leucina	Leu	69,90 ± 0,43
Fenilalanina	Phe	38,89 ± 0,24
Lisina	Lys	58,97 ± 0,09
Total de aminoácidos		1000,00 ± 0,32

Média ± desvio padrão de três repetições; Total de aa hidrofóbicos = Cistina (Cys), Triptofano (Trp) não identificado por este método.

Alguns aminoácidos como Glu e Asp possuem grupo carboxila na extremidade da cadeia, sendo carregados negativamente, podendo portanto, atuar como agentes estáveis através da doação de hidrogênio (MEGIAS et al., 2008; SAMARANAYAKA et al., 2011). Desta forma, a presença e composição dos aminoácidos Glu e Asp no FPD justifica a capacidade de sequestro de radicais livres apresentada por esta fração nos testes de atividade antioxidante realizados.

3.7 Atividade Antibacteriana e Antifúngica

Proteínas e peptídeos dotados de potencial antimicrobiano são considerados uma alternativa promissora contra o grande número de bactérias resistentes à antibióticos (ZASLOFF, 2002). Nos resultados dos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do ET e FPD, realizados pela técnica de microdiluição nas concentrações de 1024 a 32 µg/mL, para o ET, não foi observada inibição sobre a maioria das cepas de bactérias e fungos testadas, exceto para *Salmonella spp* ATCC 1408, *L. monocytogenes* e *E. coli* ATCC 25922 e somente na maior concentração utilizada (1024 µg/mL) visto na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima - CIM (µg/mL) de Extrato Total e Fração Proteica Dioscorina contra cepas de bactérias e de fungos

Produto (µg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>S. aureus</i> ATCC- 13150	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-108	<i>C. tropicalis</i> ATCC -13803	<i>C. tropicalis</i> LM-64	<i>A. flavus</i> LM-247	<i>A. flavus</i> LM-714	<i>Salmonella spp</i> ATCC 1408	<i>L. monocytogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>E. coli</i> ATCC 25922
1- ET (1024 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
(512 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(256 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(128 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(64 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(32 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2- FPD (1024 µg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
(512 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
(256 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(128 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(64 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(32 µg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibacteriano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antifúngico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): Não houve crescimento do microrganismo (+): Crescimento do micro-organismo

Entretanto, quando comparados com o ET, os resultados obtidos para a FPD, mostraram uma inibição mais ampla e também na maior concentração utilizada (1024 µg/mL), uma vez que além das cepas já citada, inibiu *S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus* ATCC- 13150, *P. aeruginosa* ATCC-25853, *P. aeruginosa* ATCC-25853, *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-108, *C. tropicalis* ATCC -13803, *C. tropicalis* LM-64 e *Klebsiella pneumoniae*. Tal CIM obtida pela FPD é considerada como atividade moderada de substrato frente a inibição de patógeno.

A FPD apresentou forte/ótima atividade inibitória de crescimento apenas sob a cepa de *Listeria monocytogenes*, uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, associada a doenças como meningite. Este resultado difere daquele relatado por (BEGUM; ANBAZHAKAN, 2013), que trabalhando com mucilagem extraída de tubérculos do inhame *D. esculenta*, demonstrou forte/ótima atividade de inibição para cepa de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Provavelmente o efeito antimicrobiano apresentado pela FPD deve-se à presença de cargas negativas dos aminoácidos Asp e Glu formadores de suas proteínas (Tabela 5). Estudos relatam que peptídeos com propriedades antimicrobianas são possuidores de aminoácidos carregados negativamente que apresentam alta afinidade pelos componentes estruturais dos fosfolípídeos catiônicos da parede celular (lipopolissacarídeos - LPS), os quais são os principais componentes das membranas externas das bactérias. Quando aderido a parede bacteriana causa desestabilização do LPS favorecendo o processo de lise do patógeno (BROGDEN, 2005).

É conhecido que tubérculos apresentam vários metabólitos fisiologicamente importantes como: diosgenina (DE; DE, 2005), dioscorina (HOU; CHEN; LIN, 1999), antioxidantes (ISAMAH; ASAGBA; THOMAS, 2000), esteróides (BRUNETON, 1995) e alcalóides. Assim sendo, a potencial atividade (moderada/forte) apresentada pela FPD frente as cepas bacterianas e fúngicas testadas, pode estar relacionada à presença da proteína dioscorina, bem como de algum peptídeo biativo presente nesta fração; o que sugere que novos estudos devam ser feitos no intuito de melhor caracterizar o potencial antimicrobiano da mesma.

4 Conclusão

Foi isolada uma fração proteica do extrato total de tubérculos de *D. cayennensis* (FPD) com massa molecular da principal proteína de aproximadamente 28 kDa. A FPD encontrou-se isenta de taninos, saponinas, polifenóis e compostos antinutricionais de origem proteica, como lectinas e inibidor de tripsina. Logo, as atividades biológicas descritas são atribuídas as proteínas presentes nessa fração, uma vez que do ponto de vista de massa molecular, apresentam

semelhanças com dioscorinas isoladas de outras espécies. Quanto à captura dos radicais ABTS e DPPH, a FPD apresentou considerável atividade antioxidante associada à sua composição dos aminoácidos Glu, Asp e Arg, sugerindo que a interação destes atuam em moléculas reativas tornando-as estáveis. Foi detectada atividade antibacteriana frente à cepa *L. monocytogenes*. Assim, demonstrou-se que a FPD é parte integrante das proteínas bioativas do inhame, apresentando potencial para exploração de novas atividades biológicas visando a determinação dos possíveis mecanismos de ação destas.

6 Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação pelo financiamento do projeto “Proteômica e Atividades Biológicas de Proteínas e Peptídeos com Propriedades Funcionais de Inhames Brasileiros” (aprovado no Edital MCTI/CNPq/Universal Nº 14/2014 sob Processo Nº 461649/2014-4), Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP) pelo constante apoio ao Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM).

6 Referências

- [1] Stipanuk, M.; Caudill, M. (2013). *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. 3.^a ed. Elsevier Saunders: 968 p.
- [2] Silva, M. C., CORRÊA, A., Santos, C. D. D., Marcos, F. C. A., & Abreu, C. M. P. D. (2010). Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) eo efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 103-107.
- [3] Pusztai, A., Grant, G., Bardocz, S., Gelencser, E., & Hajos, G. Y. (1997). Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soyabean whey of high agglutinin content. *British Journal of Nutrition*, 77(06), 933-945.
- [4] Armour, J. C., Perera, R. L., Buchan, W. C., & Grant, G. (1998). Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(2), 225-231.

- [5] ZanonIII, L. W. A. J. (2009). Desenvolvimento vegetativo em diferentes hastes da planta de mandioca em função da época de plantio. *Ciência Rural*, 39(3).
- [6] Diop, A.; Calverley, D. J. B. Storage and processing of roots and tubers in tropics. Rome: Food and Agricultural Organization of United Nations; Agro-Industries and Postharvest Management Service Agro Supports System Division. 1998. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/X5444E/E/x5414e00.htm#contents/> Acesso em: 26 jul. 2016.
- [7] Ramos Filho, M. M., Ramos, M. I. L., & Hiane, P. A. (1997). Avaliação Química do Inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott) Cultivado em Solo Alagadiço na Região Pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 15(2).
- [8] Conlan, S., Griffiths, L. A., Turner, M., Fido, R., Tatham, A., Ainsworth, C., & Shewry, P. (1998). Characterisation of the yam tuber storage protein dioscorin. *Journal of plant physiology*, 153(1-2), 25-31.
- [9] Lu, Y. L., Chia, C. Y., Liu, Y. W., & Hou, W. C. (2012). Biological activities and applications of dioscorins, the major tuber storage proteins of yam. *Journal of traditional and complementary medicine*, 2(1), 41-46.
- [10] Guerreiro, L. M. R. (2002). Avaliação de amidos nativos em condições de estresse adaptados ao processamento de alimentos..
- [11] Lin, P. L., Lin, K. W., Weng, C. F., & Lin, K. C. (2009). Yam storage protein dioscorins from *Dioscorea alata* and *Dioscorea japonica* exhibit distinct immunomodulatory activities in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4606-4613.
- [12] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254..
- [13] Ayoola, G. A., Coker, H. A., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.
- [14] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.

[15] Albrethsen, J. (2007). Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 53(5), 852-858.

[16] White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1900). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 8(4), 170-177.

[17] de Azevedo Moreira, R., & de Oliveira, J. T. A. (1983). Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. *Biologia plantarum*, 25(5), 336-342.

[18] Xavier-Filho, J., Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M., Macedo, M. L. R., ... & Grant, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem*, 37(4), 1139-1143.

[19] Xavier Filho, J., Biológicos, P., Dos Inibidores, D. P., Cisteínicas, S. E., & Plantas, E. (1992). THE BIOLOGICAL ROLES OF SERINE AND CYSTEINE PROTEINASE INHIBITORS IN PLANTS 1.

[20] Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.

[21] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.

[22] Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food chemistry*, 72(1), 119-125..

[23] Cleeland, R., & Squires, E. (1991). Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*, 3, 739-787..

[24] Nascimento, P. F., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antonioli, A. R., Santos, P. O., Barbosa-Júnior, A. M., & Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*, 17(1), 108-113.

- [25] Pereira, F. D. O., Mendes, J. M., Lima, I. O., Mota, K. S. D. L., Oliveira, W. A. D., & Lima, E. D. O. (2015). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical biology*, *53*(2), 228-234..
- [26] Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*, *11*(3), 137-147..
- [27] Antunes, R. M. P., Lima, E. O., Pereira, M. S., Camara, C. A., Arruda, T. A., Catão, R. M. R., ... & Silva, T. M. S. (2006). Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Rev Bras Farmacogn*, *16*(4), 517-24.
- [28] Freire, I. C. M., Pérez, A. L. A. L., Cardoso, A. M. R., Mariz, B. A. L. A., Almeida, L. F. D., Cavalcanti, Y. W., & Padilha, W. W. N. (2014). Antibacterial Activity of Essential Oils against Strains of *Streptococcus* and *Staphylococcus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *16*(2), 372-377..
- [29] Deswal, D. P., & Chand, U. (1997). Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. *Seed Science and Technology*, *25*(3), 409-417.
- [30] Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, *97*(2), 305-311.
- [31] Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *97*(7), 1027-1031.
- [32] Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(4), 275-280.
- [33] Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G. (2007). Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, *110*(3), 391-400.
- [34] Hsu, F. L., Lin, Y. H., Lee, M. H., Lin, C. L., & Hou, W. C. (2002). Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates

exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6109-6113.

[35] Liao, Y. H., Tseng, C. Y., & Chen, W. (2006). Structural characterization of dioscorin, the major tuber protein of yams, by near infrared Raman spectroscopy. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 28, No. 1, p. 119). IOP Publishing.

[36] Kuznetsov, V. V., Radyukina, N. L., & Shevyakova, N. I. (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5), 583.

[37] Xue, Y. L., Miyakawa, T., Sawano, Y., & Tanokura, M. (2012). Cloning of genes and enzymatic characterizations of novel dioscorin isoforms from *Dioscorea japonica*. *Plant science*, 183, 14-19.

[38] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, Legume lectin structure, *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzymil.* 1383 (1998) 9-36. doi:10.1016/S0167-4838(97)00182-9

[39] Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2), 219-243.

[40] Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. D., Vieira, R. F., Silva, J. D., & Agostini-Costa, T. D. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(4), 1215-1221.

[41] Paulino Machado Magalhães, L. (2004). Estudo Fitoquímico e Biológico das folhas da *dioscorea alata* (DIOSCOREACEAE).

[42] Chan, Y. S., & Ng, T. B. (2013). A lectin with highly potent inhibitory activity toward breast cancer cells from edible tubers of *Dioscorea opposita* cv. nagaimo. *PLoS one*, 8(1), e54212.

[43] Gaidamashvili, M., Ohizumi, Y., Iijima, S., Takayama, T., Ogawa, T., & Muramoto, K. (2004). Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26028-26035.

[44] Teo, C. R. P. A., Prudencio, S. H., Coelho, S. R., & Teo, M. S. (2010). Obtenção e caracterização físico-química de concentrado protéico de folhas de mandioca. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(9), 993-999.

- [45] Cereda, M. P., & Lopes, A. M. (2003). Determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca. *V Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos*.
- [46] Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P. D. L., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.
- [47] Kanatt, S. R., Arjun, K., & Sharma, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Research International*, 44(10), 3182-3187.
- [48] Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M., & Dalton, D. A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist*, 188(4), 960-976.
- [49] Hou, W. C., Lee, M. H., Chen, H. J., Liang, W. L., Han, C. H., Liu, Y. W., & Lin, Y. H. (2001). Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4956-4960.
- [50] Nagai, T., Nagashima, T., Suzuki, N., & Inoue, R. (2005). Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(1-2), 133-138.
- [51] Jheng, Y. J., Tsai, W. Y., Chen, K. H., Lin, K. W., Chyan, C. L., Yang, C. C., & Lin, K. C. (2012). Recombinant dioscorins of the yam storage protein expressed in *Escherichia coli* exhibit antioxidant and immunomodulatory activities. *Protein Expression and Purification*, 85(1), 77-85.
- [52] Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, 9(1), 1-32.
- [53] Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15036-15040.
- [54] Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(3), 441-448.

[55] Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.

[56] Megías, C., Pedroche, J., del Mar Yust, M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J. (2009). Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 42(9), 1496-1500.

[57] Samaranyaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254.

[58] Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870), 389-395.

[59] Begum, A. T., & Anbazhakan, S. (2013). Evaluation of antibacterial activity of the mucilage of *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill. *Int J Mod Biol Med*, 4(3), 140-146.

[60] Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.

[61] De, D., & De, B. (2005). Elicitation of diosgenin production in *Dioscorea floribunda* by ethylene-generating agent. *Fitoterapia*, 76(2), 153-156.

[62] Hou, W. C., Chen, H. J., & Lin, Y. H. (1999). Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam (*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities. *Plant Science*, 149(2), 151-156.

[63] Isamah, G. K., Asagba, S. O., & Thomas, A. E. (2000). Lipid peroxidation, O-diphenolase, superoxide dismutase and catalase profile along the three physiological regions of *Dioscorea rotundata* Poir cv Omi. *Food chemistry*, 69(1), 1-4.

[64] Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier publishing.

4. CONCLUSÃO

- Foi isolada a fração proteica dioscorina (FPD) em tubérculos de *Dioscorea cayennensis*;
- Estruturalmente, através da análise do perfil eletroforético e espectrometria de massas MALDI-ToF as proteínas presente na FPD apresentaram um perfil de massa majoritária aproximadamente 28 kDa;
- FPD não possui interferentes de metabólitos secundários como: saponinas, flavonóis, flavonas e xantonas;
- FPD não possui capacidade aglutinante de hemácias de coelho e ação inibitória para enzima tripsina. Possivelmente livre de compostos antinutricionais (lectinas e inibidores de tripsina);
- A composição aminoacídica do FPD aponta o maior teor de Glu e Asp aminoácidos carregados negativamente e Arg aminoácidos carregados positivamente;
- FPD possui potencial antioxidante demonstrado pelo sequestro de radicais livres nos métodos de ABTS e DPPH;
- FPD foi capaz de inibir fortemente bactérias gram-positivas *L. monocytogenes*, não possuindo atividade contra o crescimento das espécies de fungos testadas.

REFERÊNCIAS

- ALETOR, V. A.; ADEOGUN, O. A. Nutrient and anti-nutrient components of some tropical leafy vegetables. **Food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 375-379, 1995.
- ANDRADE, Genira Pereira de. **Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea spp.*) em áreas produtoras do Nordeste do Brasil**. 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ARMOUR, Julia C. et al. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, n. 2, p. 225-231, 1998.
- ASZTALOS, Bela F. et al. Protease inhibitor-based HAART, HDL, and CHD-risk in HIV-infected patients. **Atherosclerosis**, v. 184, n. 1, p. 72-77, 2006.
- AWOYINKA, A. F.; ABEGUNDE, V. O.; ADEWUSI, S. R. A. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 21-28, 1995.
- BECK-SAGUÉ, Consuelo M.; JARVIS, William R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **The Journal of infectious diseases**, p. 1247-1251, 1993.
- BERHOW, Mark A. et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 11-22, 2000.
- BEZERRA, VALÉRIA SALDANHA et al. Raízes de mandioca minimamente processadas: efeito do branqueamento na qualidade e na conservação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 3, p. 564-575, 2002.
- BOUIC, Patrick JD. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 4, n. 6, p. 471-475, 2001.
- BRASIL. Resolução CNNPA nº 12, de 1978. Aprova as Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 24 de julho de 1978.
- BRESSAN, Eduardo de Andrade. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea spp.*) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira-SP**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BRITO, Thaís Trindade et al. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea sp.*) in natura e minimamente processado. **Scientia Plena**, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2011.

- CAMBIE, Richard C.; FERGUSON, Lynnette R. Potential functional foods in the traditional Maori diet. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523, p. 109-117, 2003.
- CHANG, Sue-Joan et al. Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1720-1725, 2004.
- CHEN, Po-Yen et al. Continuous hot pressurized solvent extraction of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging compounds from Taiwan yams (*Dioscorea alata*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1945-1949, 2004.
- CONLAN, Steven et al. Characterisation of the yam tuber storage protein dioscorin. **Journal of plant physiology**, v. 153, n. 1-2, p. 25-31, 1998.
- CZAPLA, Thomas H. Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants. In: **Advances in insect control: The role of transgenic plants**. CRC Press, 1997.
- DAS, Abhishek et al. Phytochemical analysis, antioxidant and anticancer potential of leaf extracts from edible greater yam, *Dioscorea alata* L., from north-east India. **Int. J. Phytopharmacol**, v. 5, p. 109-119, 2014.
- DIOP, Aliou; CALVERLEY, D. J. B. Storage and processing of roots and tubers in the tropics. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agro-industries and Post-Harvest Management Service, Agricultural Support Systems Division**. Available at: <http://www.fao.org/docrep/X5415E/X5415E00.htm>, 1998. Acesso em: 26 jul. 2016.
- DI STASI, L. CL Química de produtos naturais: Principias constituintes ativos. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed. Unesp, São Paulo, 1996. p.109-127.
- FAGUNDES, Lovane Klein et al. Desenvolvimento vegetativo em diferentes hastas da planta de mandioca em função da época de plantio. **Ciênc. rural**, v. 39, n. 3, p. 657-663, 2009.
- FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**/Agricultural statistic database. Roma. World Agricultural Information Center, 2014. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> >. Acesso em: 26 jul. 2016.
- FERNANDO, R. **Alimentos tradicionales y no tradicionales**. Roma: FAO, 1980. 168 p.
- FRANZENER, Gilmar et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*-DOI: 10.4025/actasciagron.v25i2.2124. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.
- GAIDAMASHVILI, M.; VAN STADEN, J.; ELOFF, J. N. Lectin-like proteins from South African plants used in traditional medicine. **South African journal of botany**, v. 68, n. 1, p. 36-40, 2002.
- HEREDIA ZÁRATE, N. A.; VIEIRA, M.; MINUZZI, A. Produção de cará (*Dioscorea* sp.) em diferentes densidades de plantio. **Ciênc. Agrotec**, v. 24, n. 2, 2000.p. 387 391.

HEREDIA ZÁRATE, N. A.; VIEIRA, M. C.; MINUZZI, ANDRÉIA. Brotação de seis tipos de mudas dos clones de inhame roxo e mimoso. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 4, p. 699-704, 2002. p. 699 704.

HOU, Wen-Chi et al. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4956-4960, 2001.

HOU, Wen-Chi; HSU, Feng-Lin; LEE, Mei-Hsien. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. **Planta medica**, v. 68, n. 12, p. 1072-1076, 2002.

HUANG, Chien-Chun; CHEN, Woan-Ching; WANG, Chiun-CR. Comparison of Taiwan paddy-and upland-cultivated taro (*Colocasia esculenta* L.) cultivars for nutritive values. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 250-256, 2007.

HSU, Feng-Lin et al. Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6109-6113, 2002.

KASASIAN, L. **Pest control in tropical root crops**. London: Center for Overseas Pest Research, 1978. 235 p. (PANS. Manual, 4).

KERWIN, S. M. Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 4, n. 3, p. 263-272, 2004.

LEONEL, Magali; CEREDA, Marney Pascoli. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.

LIAO, Yu-Hsiu; TSENG, Chin-Yin; CHEN, Wenlung. Structural characterization of dioscorin, the major tuber protein of yams, by near infrared Raman spectroscopy. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2006. p. 119.

LIMA, Vera LM et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.

LIN, Pei-Lan et al. Yam storage protein dioscorins from *Dioscorea alata* and *Dioscorea japonica* exhibit distinct immunomodulatory activities in mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4606-4613, 2009.

LIN, Jau-Tien et al. Effect of harvest time on saponins in Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, n. 2, 2009.

LU, Yeh-Lin et al. Biological activities and applications of dioscorins, the major tuber storage proteins of yam. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 2, n. 1, p. 41-46, 2012.

MALUCHE, Maria Eduarda; SANTOS, Jairo Ivo dos. Candida sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE,R.S.N.;CORDEIRO,R.A. et al.,Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of Candida parapsilosis. **Rev.Inst.Med.Trop.** São Paulo, v.48.n.1,jan/fev.2006.

MENDES, Luciene do Nascimento; DA SILVA, Jearbes Alexandre; FAVERO, Luiz Andrea. Panorama da produção e comercialização do inhame no mundo e no Brasil e sua importância para o mercado pernambucano: uma análise das cinco forças competitivas. In: CONGRESSO ONLINE DE ADMINISTRAÇÃO, 10., 2013. **Anais.** p. 1-15, 2013.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia: a produção no caminho da competitividade. **Bahia Agrícola (Brasil)**.(Nov, v. 4, n. 2, p. 39-48, 2001.

MESQUITA, A. S. Inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) e taro (*Colocasia esculenta* L.): Cenários dos mercados brasileiro e internacional. **II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro**, v. 2, p. 215-238, 2002.

MONTEIRO, D. A.; PERESSIN, V. A. Cultura do inhame. In: CEREDA, M. P. (Org.). Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas. **São Paulo: Fundação Cargill**, 2002. p. 511-518. (Fundação Cargill. Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 2).

MONTEIRO, Samantha Zucatti. **Utilização de mesclas de farinhas de arroz, Inhame e quinoa na elaboração de disco de pizza pré assado sem glúten e sem lactose**. 2013. 82 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MOURA, Romero Marinho. Principais doenças do inhame-da-costa no nordeste do Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 3, p. 180-199, 2006.

NAGAI, Takeshi et al. Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 1-2, p. 133-138, 2005.

NEVEL , V. Christian et al. Inhibitory action of spray dried blood plasma and whole egg powder on lectins in extracts of several legume seeds: a qualitative approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 3, p. 319-326, 1998.

OSZMIANSKI, J. Aronia (*Aronia melanocarpa* Elliot) fruits and skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) roots are very high in biologically active flavonoids. **Farm Pol**, v. 15, p. 726-30, 2001.

PEREIRA, A. da S.; COSTA, DM da. Qualidade e estabilidade de “chips” de batata. **Horticultura brasileira**, v. 15, n. 1, p. 62-65, 1997.

PÉREZ, E. E. et al. Estimation of the dioscorin extracted from cultivars of yams (*Dioscorea* genus) growing in the Venezuelan amazonas. **Acta horticulturae**, 2014.

PESHIN, Archana. Influence of storage temperature and reconditioning on the biochemical composition of potato tubers. **Journal of food science and technology**, v. 37, n. 2, p. 126-129, 2000.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PEUMANS, Willy J. et al. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, v. 211, n. 4, p. 546-554, 2000.

PRABOWO, Aditya Yoga; ESTIASIH, Teti; PURWANTININGRUM, Indria. UMBI GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.) SEBAGAI BAHAN PANGAN MENGANDUNG SENYAWA BIOAKTIF: KAJIAN PUSTAKA [IN PRESS JULI 2014]. **Jurnal Pangan dan Agroindustri**, v. 2, n. 3, p. 129-135, 2014.

PUSZTAI, A. et al. Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soyabean whey of high agglutinin content. **British Journal of Nutrition**, v. 77, n. 06, p. 933-945, 1997.

RAMOS FILHO, MANOEL MENDES; RAMOS, MARIA ISABEL LIMA; HIANE, PRISCILA AIKO. Avaliação Química do Inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott) Cultivado em Solo Alagadiço na Região Pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 15, n. 2, 1997.

RODRIGUES, Edvirgem et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto in vitro e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Science Agronomy, Maringá**, v. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.

SALMI, M.; JALKANEN, S. Regulation of lymphocyte traffic to mucosa-associated lymphatic tissues. **Gastroenterology clinics of north america**, v. 20, n. 3, p. 495-510, 1991.

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea spp*): aspectos básicos da cultura**. EMEPA: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A.; SEBRAE. 158 p. 1996.

SANTOS, E. S. **Cultura do inhame (*Dioscorea sp.*)**. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A. 2002. 12 p.

SANTOS, ES dos et al. Inhame e preservação ambiental. **Embrapa-Emepa João Pessoa, PB**, 2006.

SANTOS, ES dos et al. Inhame (*Dioscorea sp.*) tecnologia de produção e preservação ambiental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa**, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2007.

SHANG, Huey-Fang et al. Effects of arginine supplementation on mucosal immunity in rats with septic peritonitis. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 561-569, 2004.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2**. Springer US, 2001. p. 1-16.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins, New York, 126pp., **Chapman and Hall. London**, 1998.

SILVA, Mara Reis et al. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, 2000.

SILVA, Maria Cristina et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) eo efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 103-107, 2010.

STIPANUK, M.; CAUDILL, M. (2013). **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. 3.^a ed. Elsevier Saunders: 968 p.

SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT. **Phytomedicine**, v. 7, n. 5, p. 401-405, 2000.

SVANBORG, C. et al. Bacterial adherence and mucosal cytokine production. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, n. 1, p. 162-181, 1994.

TAVARES, Sandra Aparecida. Caracterização e utilização da mucilagem de inhame (*Dioscorea* spp.) como emulsificante em pães de forma.

TINKUANGJUN, P. Snowdrop lectin gene in transgenic plants: its potential for Asian agriculture. **AgBiotechNet**, wallingford, v.4, p. 1-5, 2002.

TSAI, Shi-Shun; TAI, F. J. Studies on the mucilage from tuber of yam (*Dioscorea alata* Linn.). I. Isolation and purification of the mucilage. **Chung-kuo nung yeh hua hsueh hui chih= Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, 1984.

TSUKAMOTO, Tsuyoshi et al. Purification and some properties of chitinases from yam, *Dioscorea opposita* Thumb. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 931-939, 1984.

VALDERRAMA, Patrícia; FABIANE, MARANGONI; CLEMENTE, Edmar. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2001.

VIDAL, Andressa Meirelles et al. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, v. 1, n. 1, p. 43-52, 2012.

XUE, You-Lin et al. Cloning of genes and enzymatic characterizations of novel dioscorin isoforms from *Dioscorea japonica*. **Plant science**, v. 183, p. 14-19, 2012.

YANG, A. H.; YEH, K. W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). **Planta**, v. 221, n. 4, p. 493-501, 2005.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO DE PESQUISA

I. DADOS DO PROJETO		
1. Título do projeto: Bioprospecção de proteínas biologicamente ativas em tubérculos nativos e cultivados no nordeste brasileiro		
2. Pesquisador responsável: Carlos Alberto de Almeida Gadelha		
3. Centro (Sigla): CCEN	4. Departamento: Biologia Molecular	
5. Número de protocolo: 082/2015	6. Data de submissão: 20/05/2015	7. Data da relatoria: 31/07/2015 (ad referendum)
8. Apresentação do projeto: O presente projeto propõe realizar a bioprospecção de proteínas biologicamente ativas em raízes e tubérculos cultivados no Brasil.		
9. Adequação com legislação vigente:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
9.1 Comentários:		
10. Substituição de metodologia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input checked="" type="checkbox"/> NÃO
10.1 Comentários: (Se achar necessária, justifique e sugira uma nova metodologia para redução do número de animais)		
II. INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS		
1. Espécie: Coelhos albinos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	2. Número amostral: 4	
3. Justificativa do número amostral:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
3.1 Comentários:		
4. Acomodação e manutenção:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
4.1 Comentários:		
5. Manipulação dos animais:	<input type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
4.1 Comentários:		

A manipulação dos animais não foi descrita no projeto.

6. Analgesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

6.1 Comentários:

Não se aplica

7. Anestesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

7.1 Comentários:

Não se aplica

8. Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

8.1 Comentários:

Não se aplica

III. SITUAÇÃO DO PROJETO

Aprovado *Com pendência* *Negado*

1. Considerações sobre o parecer:

Este Projeto é composto por Título, Introdução, Fundamentação teórica, Metodologia e Referências. Apresenta uma boa fundamentação teórica, clareza de ideias, grande objetividade e adequação da metodologia aos objetivos propostos. Tem uma grande importância científica, uma vez que investiga novas substâncias biofuncionais, possibilitando seu uso como alimento funcional e terapêutico. Com base nestes argumentos, o parecer é favorável a aprovação e execução do projeto, salvo melhor juízo deste conselho.

João Pessoa, 31 de Julho de 2015.
Comissão de Ética no Uso de Animal.

18/04/2017

Gmail - Your co-authored submission



Tatiane Santi Gadelha <santi.tatiane@gmail.com>

Your co-authored submission

International Journal of Biological Macromolecules <EvisSupport@elsevier.com>

17 de abril de 2017 02:22

Responder a: biomac.journal@elsevier.com

Para: santi.tatiane@gmail.com

Dear Dr. Santi,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: International Journal of Biological Macromolecules

Title: Obtaining Dioscorin Proteic Fraction of Yam (*Dioscorea cayennensis*): Biochemical Characterization and Biological Activities

Corresponding Author: Carlos Gadelha

Co-Authors: Aleson Pereira Sousa, Edilza Silva Nascimento, Samara Batista Montenegro, Edeltrudes de Oliveira Lima, Daniele Figueredo Silva, Marta Suely Madruga, Tatiane Santi

Carlos Gadelha submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IJBIMAC

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at calbgadelha@gmail.com.

Thank you,
International Journal of Biological Macromolecules

This message was sent automatically. Please do not reply