

Artigo**Avaliação do Potencial Antimicrobiano de uma Espécie de "Inhame" (*Dioscorea scabra* Humb. & Bonpl. ex Willd.) Contra Microorganismos Causadores de Infecções Veterinárias****Tenfen, A.; Siebert, D. A.; Zimath, P. L.; Bastos, J.; Guimarães, C. L.; Cordova, C. M. M.; Botelho, T. K. R.; Alberton, M. D. A.****Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (3), 616-625. Data de publicação na Web: 2 de maio de 2019<http://rvq.sbj.org.br>**Evaluation of the Antimicrobial Potential of a "Yam" (*Dioscorea scabra*) Against Microorganisms that Cause Veterinary Infections**

Abstract: The aim of this study was to evaluate the biological potential of the crude hydroalcoholic extract (EBH) and fractions (FAcOEt and FBuOH) from the roots of *Dioscorea scabra*. The EBH and its fractions were submitted to antimicrobial activity tests against bacteria with and without cell-wall, and yeasts from the *Candida* genus. The phytochemical profile of EBH was determined by colorimetric assays and analysis by HPLC in comparison to standard diosgenin. Phytochemical analysis showed the presence of phenols, tannins, flavonoids, xanthones, catechins, steroids, free triterpenoids and saponins, characteristics of the genus. By HPLC analysis, it was possible to identify the presence of diosgenin in the analysed extract. The species was active against all tested bacterial strains, being FBuOH the most active against *Mycoplasma arginini* species. In the antifungal activity test, samples showed activity against *Candida albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, with the EBH and FBuOH showing the best results.

Keywords: *Dioscorea scabra*; Diosgenin; Antibacterial activity; Antifungal activity.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e frações (FAcOEt e FBuOH) das raízes de *Dioscorea scabra*. O EBH e suas frações foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias com e sem parede celular, além de leveduras do gênero *Candida*. O perfil fitoquímico do EBH foi determinado através de ensaios colorimétricos e este foi analisado por CLAE, em comparação a um padrão de diosgenina. A análise fitoquímica mostrou a presença de fenóis, taninos, flavonoides, xantonas, catequinas, esteroides e triterpenoides livres, além de saponinas, características do gênero. Através da análise por CLAE, foi possível identificar a presença de diosgenina no extrato avaliado. A espécie mostrou-se ativa contra todas as cepas bacterianas testadas, sendo a FBuOH a mais ativa contra a espécie *Mycoplasma arginini*. Nos testes de atividade antifúngica, as amostras apresentaram atividade contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, sendo que o EBH e a FBuOH demonstraram os melhores resultados.

Palavras-chave: *Dioscorea scabra*, Diosgenina, Atividade antibacteriana, Atividade antifúngica.

* Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Ciências Farmacêuticas, R. São Paulo 2171, Itoupava Seca, CEP 89030-001, Blumenau-SC, Brasil.

 michele@furb.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190047](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190047)

Avaliação do Potencial Antimicrobiano de uma Espécie de “Inhame” (*Dioscorea scabra* Humb. & Bonpl. ex Willd.) Contra Microorganismos Causadores de Infecções Veterinárias

Adrielli Tenfen,^a Diogo A. Siebert,^a Priscila L. Zimtath,^a Juliana Bastos,^b Cláudio L. Guimarães,^a Caio M. M. de Cordova,^a Tatiani K. R. Botelho,^a Michele D. Alberton,^{a,*}

^a Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Ciências Farmacêuticas, R. São Paulo 2171, Itoupava Seca, CEP 89030-001, Blumenau-SC, Brasil.

^b Universidade Regional de Blumenau, Laboratório de Cromatografia, R. São Paulo 2171, Itoupava Seca, CEP 89030-001, Blumenau-SC, Brasil.

* michele@furb.br

Recebido em 24 de abril de 2018. Aceito para publicação em 13 de março de 2019

1. Introdução

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção e processamento do material vegetal

2.2. Análise fitoquímica e cromatográfica do extrato bruto de *D. scabra*

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise fitoquímica e cromatográfica do extrato bruto de *D. scabra*

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

4. Considerações Finais

1. Introdução

A preocupação com a origem dos alimentos, sua qualidade e possíveis riscos à saúde decorrentes de sua ingestão cresceu muito nos últimos anos. A política alimentar adotada no século XX, embora tenha gerado elevados índices de produtividade, também foi responsável por enormes prejuízos para a saúde e para o meio ambiente. Para alcançar tais índices, foi necessária a utilização de

grande quantidade de insumos como agrotóxicos, pesticidas, antibióticos, promotores de crescimento, hormônios, entre outros, nas lavouras e na criação intensiva de animais, adotada em vários países do mundo.^{1,2} O alto nível de antimicrobianos presentes na alimentação, mesmo que em doses subterapêuticas, permitiu que a microbiota normal dos animais fosse rapidamente selecionada, tornando-a resistente.³

Dentre as infecções que emergiram entre os animais, estão as micoplasmoses, causadas por microrganismos da classe Mollicutes, dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, os menores microrganismos de vida livre, que acometem diversas espécies de animais de corte, como bovinos, suínos, caprinos, ovinos e aves. Estes agentes estão comprovadamente envolvidos em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozoides, como diminuição da motilidade que resulta em baixa qualidade do sêmen. Este fato causa interferência com a maturação espermática e diminuição da resistência do espermatozoide,⁴ abortos e a infertilidade, contribuindo sensivelmente para a diminuição da produção de leite e carne.⁵ Observou-se na última década um crescente aumento de casos clínicos que não respondem à terapêutica⁶, sendo que alguns estudos mostram que a taxa de ocorrência de micoplasmas no Brasil passa de 50 % em bovinos⁵ e em caprinos podem atingir até 100 % do rebanho.⁶

As bactérias do gênero *Salmonella* e *Shigella* são amplamente distribuídas, sendo consideradas como um dos principais microrganismos envolvidos em surtos de origem alimentar, sendo as aves e os bovinos os principais responsáveis pela sua disseminação. A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais, a existência de portadores assintomáticos e sua permanência nos alimentos contribuem para que estes microorganismos assumam um papel de relevância na saúde pública mundial. Apesar dos avanços tecnológicos alcançados, este problema ainda ocorre mundialmente, e programas permanentes de controle e erradicação devem ser adotados.⁷

No que diz respeito às infecções fúngicas, de acordo com a literatura, *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente envolvida nos casos em animais, porém, outras espécies como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, dentre outras, também são citadas como agentes de tais infecções.⁸ Um estudo analisou dados de vacas em lactação e encontrou cerca de 12 %

de animais acometidos por mastite causada por leveduras, principalmente por espécies do gênero *Candida*. A espécie *C. albicans* foi isolada de cerca de 6 % das vacas leiteiras que haviam sido tratadas com antimicrobianos e que apresentavam mamites resistentes à terapêutica, causando problema no desenvolvimento da pecuária leiteira.³

Dioscorea scabra Humb. & Bonpl. ex Willd. (sin. *Dioscorea multiflora* Mart. ex Griseb.), é uma trepadeira herbácea que forma tubérculos, pertencente à família Dioscoraceae, sendo conhecida popularmente como “inhame” ou “cará”.⁹⁻¹¹ Está distribuída em todos os continentes, e no Brasil encontra-se desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul.¹² Além de ser consumida como alimento, na prática clínica seus tubérculos são tradicionalmente utilizados para o tratamento de anorexia, diarreia crônica, leucorreia,gota, osteoporose, infecções virais e micoses.¹³⁻¹⁶ Muitas espécies do gênero são ricas em saponinas esteroidais, sendo diosgenina e yamogenina as principais saponinas encontradas na espécie *D. scabra*.¹⁷ Estudos atribuem às saponinas de *Dioscorea* as atividades antiplaquetária, antitumoral, antinflamatória, antibacteriana, hipoglicêmica e hipolipidêmica, além de potente atividade citotóxica.¹⁸⁻²⁰

Observando o potencial do gênero *Dioscorea* e da espécie *D. scabra*, este trabalho teve como objetivo realizar uma análise fitoquímica do extrato bruto hidroalcoólico, bem como avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico e frações das raízes desta espécie contra microorganismos causadores de infecções veterinárias.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção e processamento do material vegetal

Raízes da espécie *D. scabra* foram coletadas em Lages, SC ($27^{\circ} 49' 0''$ Sul, $50^{\circ} 19' 35''$ Oeste), nos meses de abril e maio de 2010. A planta foi identificada pela Dr.^a Mizué Kirizawa do Instituto de Botânica de São Paulo e a exsicata está catalogada no herbário Roberto Miguel Klein - Blumenau (FURB) sob o número de registro 18003.

As raízes secas e cortadas (561 g de raízes) foram submetidas a processo de maceração com álcool etílico 70 % em temperatura ambiente. O extrato obtido (43 g) foi concentrado em evaporador rotatório a vácuo sob pressão reduzida. Uma alíquota de 20,9 g do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) foi ressuspêndido em água e particionado com acetato de etila e butanol para a obtenção das frações FAcOEt e FBuOH, respectivamente.

2.2 Análise fitoquímica e cromatográfica do extrato bruto de *D. scabra*

O EBH foi submetido à análise fitoquímica preliminar de acordo com Matos.²¹ Foi realizada a pesquisa de fenóis, taninos, flavonoides, xantonas, catequinas, esteroides e triterpenos, saponinas, antocianinas e antocianidinas, leucoantocianidinas, resinas, alcaloides, bases quaternárias, quinonas, antranóis e cumarinas.

O EBH foi avaliado através de cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Hewlett-Packard® modelo HP-1100 em coluna C18 (250 x 40 mm, 5 mm), equipado com o software ChemStation versão A.06.01. A amostra foi diluída em metanol em uma concentração de 5 mg mL⁻¹. Como fase móvel, foi utilizado um sistema binário isocrático de acetonitrila/água (90:10), com fluxo de 1mL·min⁻¹ a uma temperatura de

25° C. Para comparação, foi utilizado um padrão de diosgenina (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) diluído em metanol.

Uma alíquota do extrato bruto (0,278 g) foi submetida à hidrólise ácida com 20 mL de H₂SO₄ 1,5 M, sob refluxo a 100 °C, durante 5 horas.¹⁸ O extrato hidrolisado foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL), concentrado em rotaevaporador e analisado em CLAE nas mesmas condições descritas para o EBH. O extrato e o padrão foram detectados a 194 nm, de acordo com o procedimento descrito por Niño e colaboradores.²²

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Microorganismos testados

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e frações, foram utilizadas as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), gram-negativas *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Salmonella paratyphi* (ATCC 11511), *Salmonella typhi* (ATCC 19430), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Shigella sonnei* (ATCC 29330), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), além de cepas de molicutes *Ureaplasma urealyticum* T960 (ATCC 27618), *Mycoplasma genitalium* (ATCC 33530) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (MMC) (PG3 NCTC 10137) e *Mycoplasma arginini* (PG18, Institut Pasteur). Para o crescimento de bactérias com parede celular foi utilizado o caldo Trypticase Soy Broth (TSB) (Sigma-Aldrich, Alemanha). O microorganismo *U. urealyticum* foi cultivado em meio de cultura U10 (Sigma-Aldrich, Alemanha), *M. genitalium* e MMC em meio líquido SP4 (Sigma-Aldrich, Alemanha), e, *M. arginini* em meio líquido de Arginina (MLA) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Os experimentos de atividade antifúngica foram realizados com cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C.*

glabrata clinicamente isoladas e identificadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Regional de Blumenau. As cepas foram repicadas, inoculadas em Ágar sabouraud dextrose e colocadas em estufa a 26 °C por 24 a 72 horas. Posteriormente, estas espécies foram inoculadas em ágar HiCrome Candida (HiMedia®, Mumbai, Índia), e colocadas em estufa a 37 °C até observação do crescimento. As espécies foram identificadas de acordo com o aspecto e cor das colônias.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As amostras foram testadas pelo método de microdiluição em caldo em placas estéreis contendo 96 micropoços conforme recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ²³ para bactérias com parede celular e leveduras, e de acordo com Bébear & Robertson²⁴ para cepas de molicutes.

O EBH, a FAcOEt e a FBuOH foram preparados em solução aquosa contendo 1 % de DMSO e transferidos para cada poço da microplaca, contendo o meio de cultura apropriado, obtendo-se uma diluição em série de ordem dois da amostra original, com concentrações de amostra variando de 1000 a 7,81 µg.mL⁻¹. O inóculo contendo de 10⁴ a 10⁵ microrganismos por mL foi adicionado a cada poço. Uma série de poços foi reservada em cada uma das placas para o controle da esterilidade (sem inóculo adicionado), controle positivo (gentamicina, ciprofloxacino ou fluconazol), viabilidade do inóculo (sem extrato adicionado), e teste em branco (somente solvente usado para diluição das amostras).

As microplacas foram incubadas a 26 ± 1 ou 37 ± 1 °C, durante 24 ou 48 horas (dependendo do microorganismo). O crescimento dos molicutes foi detectado por observação da alteração de cor no meio de cultura. Já para as bactérias com parede celular, uma solução metanólica de cloreto de trifenil tetrazolio (5 mg mL⁻¹) foi adicionada a

cada poço, e a presença de um "botão" bacteriano avermelhado observado no fundo de cada poço. Para as leveduras, observou-se, com auxílio de luz incandescente sob fundo escuro, a turvação no micropoço. Os resultados de CIM foram expressos em µg mL⁻¹ e definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise fitoquímica e cromatográfica do extrato bruto de *D. scabra*

Os resultados obtidos na análise fitoquímica preliminar do EBH de *D. scabra* mostram a presença de fenóis, incluindo os taninos, flavonoides, xantonas, catequinas, presença de esteroides e triterpenoides livres, além das saponinas, substâncias características do gênero. Os compostos fenólicos têm significativas propriedades biológicas, como a atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante.¹⁵ Estudos com a espécie *Dioscorea opposita* Thunb reportaram a presença de compostos fenólicos na fração solúvel em clorofórmio de seus rizomas, como os dihidroestilbenos e dibenzoxipenos, que foram responsáveis pela sua significativa atividade anti-inflamatória contra TNF-α, IL-1b e COX-2, e atividade antioxidante por inibir a formação de ERO (espécies reativas de oxigênio).²⁵

A análise do EBH de *D. scabra* por CLAE, utilizando um padrão de diosgenina (Figura 1) (Sigma-Aldrich) foi realizada através da metodologia proposta por Niño e colaboradores.²² Através da comparação entre os cromatogramas obtidos com o EBH (figura 2A) e o padrão (figura 2B), observa-se que o extrato bruto de *D. scabra* apresenta um pico no mesmo tempo de retenção da diosgenina (3,1 min).

Em espécies do gênero *Dioscorea*, a diosgenina pode estar presente também na forma de glicosídeos.^{26,27} Para verificar a

presença destes, realizou-se a hidrólise ácida do EBH e sua posterior análise cromatográfica. A comparação dos cromatogramas do EBH hidrolisado (dado não apresentado) e do EBH pré-hidrólise não apresentou alteração em seus perfis, sugerindo a presença da

diosgenina apenas em sua forma livre. Esta substância já foi previamente isolada e identificada nesta espécie, além de outras do gênero, em estudos anteriores,¹⁷ sendo que sua identificação neste extrato está em concordância com dados da literatura.

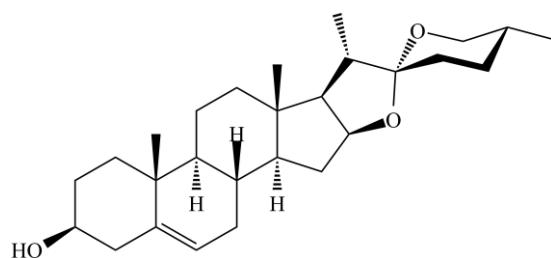


Figura 1. Estrutura da diosgenina

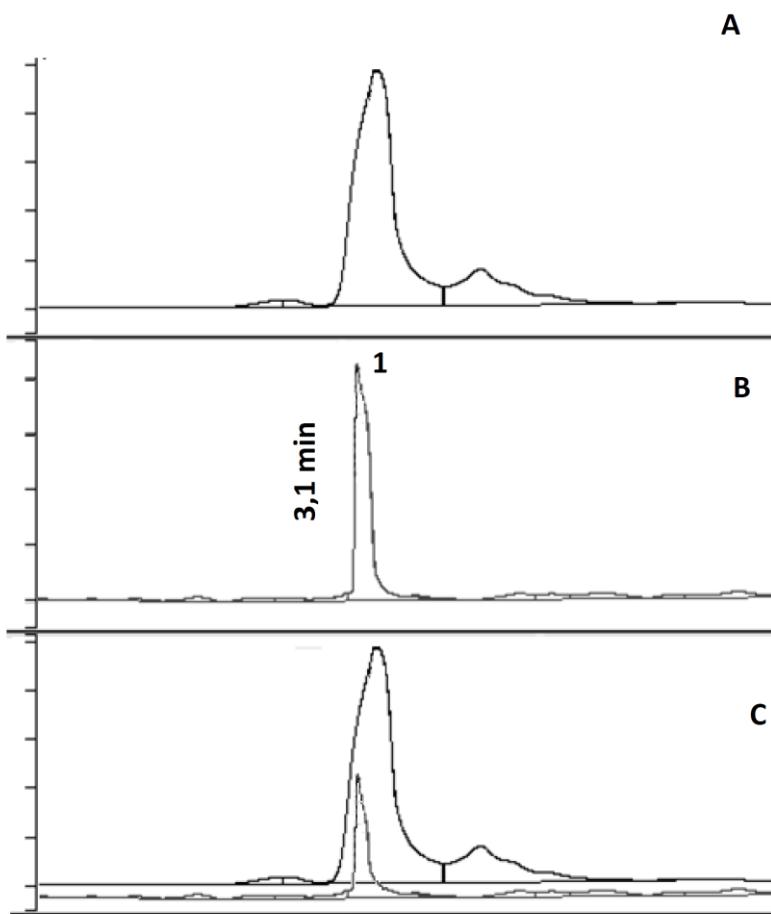


Figura 2. A) Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *D. scabra*, antes da hidrólise B) Cromatograma do padrão de diosgenina (1). C) Sobreposição dos cromatogramas do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *D. scabra* e do padrão de diosgenina

3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Desde que foram introduzidos na terapêutica há 75 anos atrás, o uso de milhões de toneladas de antibióticos levou ao desenvolvimento, por parte das bactérias, de mecanismos de resistência a quase todos os agentes antimicrobianos usados comumente na terapia de infecções.²⁸ Devido a esta problemática, faz-se necessária a constante e

incansável busca por novas moléculas com potencial antimicrobiano.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com cepas de bactéria com e sem parede celular, além de leveduras. Para avaliação dos resultados, foi adotado o critério de Ríos & Recio,²⁹ considerando-se ativas as amostras que apresentaram CIM ≤ 1000 µg.mL⁻¹. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana apresentado pelos extratos e frações de *D. scabra*.

| | CIM ^a (µg mL ⁻¹) | | | |
|--|---|--------|-------|--------------------------------|
| | Extrato Bruto | FACOEt | FBuOH | Controle positivo ^b |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | 125 | 208 | 208 | 1,5 |
| <i>Mycoplasma arginini</i> | 125 | 333 | 100 | 1,5 |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> | 250 | 250 | 250 | 1,5 |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 250 | 333 | 166 | 1,5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | >1000 | 500 | >1000 | 0,005 |
| <i>Escherichia coli</i> | >1000 | 500 | >1000 | 0,010 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >1000 | 1000 | >1000 | 0,010 |
| <i>Bacillus cereus</i> | >1000 | >1000 | >1000 | 0,002 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 0,002 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 310 | 250 | >1000 | 0,020 |
| <i>Salmonella paratyphi</i> | 250 | 125 | 250 | 0,020 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 250 | 250 | 500 | 0,020 |
| <i>Shigella flexneri</i> | 500 | 500 | 500 | 0,010 |
| <i>Shigella sonnei</i> | 500 | 500 | 500 | 0,010 |
| <i>Candida albicans</i> | 125 | 500 | 375 | 31 |
| <i>Candida tropicalis</i> | >1000 | >1000 | >1000 | 31 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 250 | 1000 | 1000 | 31 |
| <i>Candida glabrata</i> | 62,5 | 500 | 62,5 | 31 |

^aCIM = Concentração inibitória mínima

^bControle positivo = ciprofloxacino, para molicutes; gentamicina, para bactérias com parede celular; fluconazol, para leveduras

Os resultados mostram que o EBH de *D. scabra* foi ativo contra todas as cepas de molicutes testadas no ensaio, apresentando

valores de CIM = 125 µg mL⁻¹ para as espécies de *Mycoplasma arginini* e *Ureaplasma urealyticum*. As frações de *D. scabra* também

se mostraram ativas estes microorganismos, sendo a FBuOH a mais ativa contra os microrganismos testados ($CIM = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *M. arginini*).

Muitos estudos reportam a atividade antibacteriana de plantas medicinais, porém poucos avaliam a atividade destas contra os molicutes,³⁰ sendo este o primeiro trabalho a avaliar a atividade contra molicutes de espécies do gênero *Dioscorea*. Estes resultados são relevantes, pois as infecções causadas por estes microorganismos, a exemplo de *M. arginini*, que tem sido responsável por graves zoonoses respiratórias em ovinos, são geralmente de difícil tratamento, além de mostrar resistência aos antibióticos de escolha.^{31,32} Estes microrganismos não possuem parede celular, tornando-os resistentes aos β -lactâmicos e a outros fármacos que atuam sobre este alvo.^{33,34} Portanto, pode-se sugerir que o mecanismo de atividade antibacteriana de *D. scabra*, neste caso, não está relacionado com a parede celular.

Contra as bactérias com parede celular, o EBH apresentou atividade interessante contra as espécies de *Salmonella* e *Shigella* testadas, sendo as espécies *S. typhi* e *S. paratyphi* as mais sensíveis à amostra. Dentre as frações, observa-se que a FAcOEt foi ativa contra a maioria das cepas testadas, com exceção de *B. cereus*. Destaca-se a atividade mostrada contra a bactéria *S. paratyphi*, com valor de $CIM = 125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os principais reservatórios de *Salmonella* são os suínos, aves e bovinos,³⁵ frequentemente envolvidos em surtos.^{36,37}

Os resultados de atividade antifúngica mostraram que o EBH de *D. scabra* apresentou atividade antifúngica contra as leveduras testadas, sendo mais efetivo contra *Candida glabrata* ($CIM = 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, os valores de CIM foram de 250 e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Todas as frações apresentaram atividade contra *C. albicans*, sendo a FBuOH a mais ativa ($CIM = 375 \mu\text{g mL}^{-1}$). Contra *C. tropicalis* o EBH e as frações não foram ativos, um resultado que tem se repetido em trabalhos publicados com outras espécies vegetais e cujo

mecanismo de resistência ainda não foi elucidado.³⁸

Espécies do gênero *Dioscorea* são popularmente utilizadas no Brasil para o tratamento de infecções fúngicas, como no caso de *Dioscorea alata*.¹⁴ Estudos realizados com outras espécies, como *D. colletii*, *D. futschauensis*, *D. deltoidea* e *D. cayenensis* confirmam o potencial antifúngico do gênero, mostrando resultados promissores relacionados à presença das saponinas esteroidais e suas agliconas.^{19,20,39,40}

4. Considerações Finais

O EBH das raízes de *D. scabra* mostrou a presença de diosgenina e possui perfil fitoquímico em concordância com a literatura para o gênero *Dioscorea*. O EBH e as frações apresentaram boa atividade antibacteriana frente a cepas de molicutes, bactérias com parede celular e fungos testados. Sendo assim, a espécie pode ser considerada promissora para novos estudos de atividade antimicrobiana e composição química, a fim de elucidar seus constituintes ativos e relacioná-los com suas respectivas ações.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Regional de Blumenau pelo financiamento do projeto e a bolsa de iniciação científica concedida à aluna Adrielli Tenfen e a todos os membros do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais – FURB. Também à Dra. Mizué Kirizawa pela identificação da espécie estudada.

Referências Bibliográficas

¹ Brito, R. B.; Junqueira, R. G. Determination of Beta-Lactam residues in milk by high

- performance liquid chromatography. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2006**, 49, 41. [[CrossRef](#)]
- ² Mitchell, J. M.; Griffiths M. W.; McEwen, S. A.; Mcnab, W. B.; Yee, A. J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection* **1998**, 61, 742. [[PubMed](#)]
- ³ Souza, W. A.; Siqueira, A. M. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **2003**, 55, 262. [[CrossRef](#)]
- ⁴ Cardoso, M. V.; Teixeira, S. R.; Miyashiro, S.; Vasconcellos, S. A.; Gregory, L.; Genvez, M.E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. *Arquivos do Instituto Biológico* **2006**, 73, 33. [[Link](#)]
- ⁵ Nascimento, M. G. F.; D'angelis F. H. F.; Nascimento, E. R.; Resende, O. A. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. *Acta Scientiae Veterinarie* **2005**, 33, 195. [[Link](#)]
- ⁶ Pretto L. G.; Muller, E. E.; Freitas, J. C.; Mettigofo, E.; Buzinhani, M. Yamaguti, M.; Salvador, R. Mastite bovina por Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2001**, 21, 143. [[Link](#)]
- ⁷ Shinohara, N. K. S.; BARROS, V. B.; Jimenez, S. M. C.; Machado, E. C. L.; Dutra, R. A. F.; Lima-Filho, J.L. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Revista Ciencia e Saúde Coletiva* **2008**, 13, 1675. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Brito, E. H. S.; Fontenelle, R. O. S.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Monteiro, A. J.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal* **2009**, 182, 320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Souza, A. V.; Bertoni, B. W.; Frnca S. C.; Pereira, A. M. S. Micropropagation of *Dioscorea multiflora* Grised. *Ciências Agropecuárias* **2011**, 35, 92. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Pedralli, G.; Carmo, C. A. S.; Cereda, M.; Puiatti, M. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. *Horicultura Brasileira* **2002**, 20, 530. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Joly, A. B.; Botânica: introdução a taxonomia vegetal, 12a ed, Nacional: São Paulo, 1998.
- ¹² Raulino, P.; Flora Ilustrada Catarinense, Fundação Cultural de Itajaí: Itajaí, 2004.
- ¹³ Liu, X. T.; Wang, Z. Z.; Xiao, W.; Zhao, H. W.; Hu, J.; Yu, B. Cholestanol and spirostanol glycosides from the rhizomes of *Dioscorea septemloba*. *Phytochemistry* **2008**, 69, 1411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Magalhães L. P. M.; Nascimento, S. C.; Albuquerque, J. F. C.; Resumos da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil, 2007. [[Link](#)]
- ¹⁵ Ma, C.; Wang, W.; Chen, Y. Y.; Liu, R. N.; Wang, R. F.; Du L. J. Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *Dioscorea opposita*. *Journal of Natural Products* **2005**, 68, 1259. [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Yin, J.; Kouda, K.; Tezuka, Y.; Tran, Q. L.; Miyahara, T.; Chen, Y.; Kadota, S. Steroidal glycosides from the rhizomes of *Dioscorea spongiosa*. *Journal of Natural Products* **2003**, 66, 646.
- ¹⁷ Costa, F. F.; Mukerjee, R. Diosgenin and yamogenin from *Dioscorea multiflora*. *Journal of Natural Products* **1984**, 47, 909. [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Li, H.; Huang, W.; Wen, Y.; Gongo, G.; Zhao, Q.; Yu, G. Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. *Fitoterapia* **2010**, 81, 1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Sautour, M.; Mitaine-Offer, A.; Lacaille-Dubois, M. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *Journal of Natural Medicine* **2007**, 61, 91. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Yang, C. R.; Zhang, Y.; Jacob, M. R.; Khan, S.I.; Zhang, Y. J.; Li, X. C. Antifungal activity of C-27 steroid saponins. *Antimicrobial Agents*

- and Chemotherapy **2006**, 50, 1710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Matos, F. J. A.; *Introdução a fitoquímica experimental*, 3a ed. Editora UFC: Fortaleza, 2009.
- ²² Niño, J.; Jiménez, D. A.; Mosquera, O. M.; Correa, Y. M. Diosgenin quantification by HPLC in a *Dioscorea polygonoides* tuber collection from Colombian flora. *Journal of Brazilian Chemistry Society* **2007**, 18, 1073. [[CrossRef](#)]
- ²³ CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*: Twenty-Second Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, **2012**. 184p. (M100-S22/ v. 32, n. 3).
- ²⁴ Bébear, C.; Robertson, J. Em: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology*, Tully, J. G.; Razin, S. eds. Academic Press: San Diego, 1996. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Wang, G.; Liu, J. S.; Lin, B. B.; Wang, G. K.; Liu, J. K. Two new furanoid norditerpenes from *Dioscorea bulbifera*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **2009**, 57, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Mola, J. L.; Araújo, E. R.; Magalhães, G. C. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. *Química Nova* **1997**, 20, 460. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Oliveira, B. H.; Bueno, D. D. Biotransformação de esteróis. *Química Nova* **1996**, 19, 233. [[Link](#)]
- ²⁸ Theretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal Global of Antimicrobiology Research* **2013**, 1, 63. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Ríos J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 100, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Benfatti, C. S.; Cordova, S. M.; Guedes, A.; Magina, M. D. A.; Cordova, C. M. M. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. frente a cepas de molicutes. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* **2010**, 1, 33. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Cordova, S. M.; Benfatti, C. S.; Magina, M. D. A.; Guedes, A.; Cordova, C. M. M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. *Revista Brasileira Análises Clínicas* **2010**, 42, 241. [[Link](#)]
- ³² Yechouron, A.; Lefbvre, J.; Robson, H. G.; Rose, D. L.; Tully, J. G. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. *Clinical Infections Disease* **1992**, 15, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Silva, C. H. P. *Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico*, Revinter: Rio de Janeiro, 2006.
- ³⁴ Maniloff, J.; McElhaney, R. N.; Finch, L. R.; Baseman, J. B.; *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Society for Microbiology: Washington, 2005.
- ³⁵ Falcão, D. P.; Suasuuna, I.R.; Suassuna, I. Salmonelose humana e animal em Araraquara, S. Paulo: prevalência de *Shigella* em casos humanos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1975**, 9, 235. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Solari, C. A.; Reis, E. M. F.; Dias, J. C. A. R.; Hofer, E. Resistencia Antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1986**, 81, 7. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Anusz, Z. *Salmonella* hospital infection in Poland in the years 1972–1977. *Przegląd epidemiologiczny* **1979**, 33, 9. [[Link](#)]
- ³⁸ Lima, I. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, 16, 197. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Sauter, M.; Mitane-Offer, A.; Miyamoto, T.; Dongmo, A.; Lacaille-Dubois, M. A new steroid saponin from *Dioscorea cayenensis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **2004**, 52, 1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Hu, K.; Yao, X.S.; Dong, A.J.; Kobayashi, H.; Iwasaki, S.; Jing, Y.K. A New Pregnanolone Glycoside from *Dioscorea collettii* var. *hypoglaucia*. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, 299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

