



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E DE  
CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS EXTRAÍDOS DA *Agave sisalana* PERRINE**

**JULIANA PATRÍCIA DE LUNA VIEIRA**

**CAMPINA GRANDE –PB**

**2014**

**JULIANA PATRÍCIA DE LUNA VIEIRA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E DE  
CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS EXTRAÍDOS DA *Agave sisalana* PERRINE**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UEPB como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

V657a Vieira, Juliana Patrícia de Luna.  
Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e de citotoxicidade de produtos extraídos da *Agave sisalana* Perrine [manuscrito] / Juliana Patrícia de Luna Vieira. - 2014.  
65 p.

Digitado.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.  
"Orientação: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, Departamento de Farmácia".  
"Co-Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia".  
1. Sisal. 2. Resíduos de decorticação de agave. 3. DPPH. 4. HeLa. 5. *Candida albicans*. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

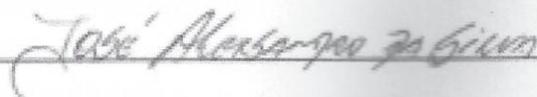
**JULIANA PATRÍCIA DE LUNA VIEIRA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E DE  
CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS EXTRAÍDOS DA *Agave sisalana* PERRINE**

Aprovado em: 27 / 08 / 2014

**BANCA EXAMINADORA**

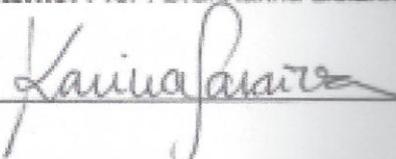
Presidente da Banca: Prof. Dr. José Alexandre da Silva (UEPB)



---

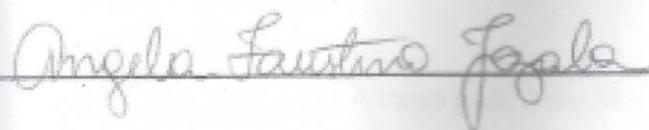
**Membros Titulares:**

Membro Interno: Prof<sup>a</sup>. Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva (UEPB)



---

Membro Externo: Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela Faustino Jozala (UNISO)



---

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais, Dona Neide e Sr. Moisés, a meus irmãos, Tarciana e Ewerton, por terem sempre me encorajado e por acreditarem em mim. E a meus avós Ivonete e João Batista de Luna, *in memoriam*, por terem me ensinado valores morais que eu jamais esquecerei.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter suprido todas as minhas necessidades, por me fazer crescer com cada obstáculo enfrentado, dando-me sabedoria e forças para continuar.

Aos meus pais, Neide e Moisés, por estarem sempre do meu lado fortalecendo-me com palavras e orações. Nunca terei como retribuir tanto amor, dedicação, lealdade, confiança e atenção. Amo vocês e tenho orgulho de ser vossa filha.

Aos meus irmãos, Tarciana e Ewerton, pelo exemplo de perseverança e fé. Vocês impulsionaram minha vitória. E como a gente diz: “missão dada é missão cumprida” (kkkkkk).

Ao meu noivo, Carlos, pela paciência, companheirismo e compreensão. Você nunca deixou de me apoiar, sei que foram momentos difíceis, principalmente pela ausência, mas mesmo assim permaneceu comigo. Amo você.

A minhas tias: Ivete que sempre teve palavras de sabedoria; Lêda que me deu apoio e pelas gargalhadas que damos juntas; Idalva por suas histórias engraçadas que tiravam de mim qualquer tristeza.

Aos meus primos Jéssica, Nathália e Thiago pelo apoio.

Ao meu orientador, pela oportunidade de fazer o mestrado, por lutar e acreditar no projeto.

Aos meus colaboradores, Camila, Morgana e Felipe, trabalharam muito, não vou esquecer os banhos de agave que levávamos (kkkkkk), das tantas quantificações, da lavagem dos vidros de antibiótico. Enfim, vocês foram essências para essa conquista.

A Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, sua ajuda foi essencial. Obrigada pela amizade e ajuda.

Ao Prof. Fábio Freitas (UFCG) pelos conselhos e por me ensinar que posso enxergar não só com os olhos, que a vida é feita com vitórias e derrotas e que cabe a cada um decidir pelo que vale a pena sofrer.

Aos meus amigos João Paulo e Alexsandra, sem vocês teria sido impossível chegar até aqui, obrigada por continuarem acreditando mesmo quando eu não mais confiava. Para vocês não caberia frase melhor: “amigo não é aquele que aparta a briga, e sim o que chega com a voadora” (kkkkkk). Confesso que não foi fácil, vocês sabem muito bem disso, e que por muitas vezes eu pensei em desistir, mas vocês sempre tinham a palavra certa que fazia com que eu voltasse a acreditar.

A Airla, técnica do LDCPF, do LABDEM e mestranda do programa. Minha amiga seu otimismo é contagiante. Suas palavras e sua fé sempre me ajudaram.

A Anna Paula, e Dani pelos conselhos. A Davy, Joffily, Yuri e Natan que sempre foram prestativos e tornaram o nosso laboratório mais divertido.

Ao LDCPF, local onde fiz parte das análises. Aos alunos de Farmácia: Ízola, Manu e Fabrício pela ajuda. Tenho certeza que vocês terão sucesso.

Ao LABDEM, em especial a Eveline, Deysiane, Fernando, Felipe, Amaro, Prof. Germano.

Ao Projeto PROCAD Casadinho que me deu a oportunidade de conhecer outra instituição de ensino na qual eu desenvolvi grande parte das minhas análises.

Ao LABIOTEC, em especial a Alex, Larissa e Gledson. Obrigada por me receber tão bem e por me ajudar nas análises.

A Suellen, uma pessoa com uma coragem imensa, posso imaginar os obstáculos que você teve que superar, aprendi muito com sua garra. Obrigada pela força.

A Valker, meu amigo da graduação que eu pude reencontrar na USP, obrigada pelas dicas e sugestões na hora das análises.

A Prof. Angela Jozala pela contribuição nas análises microbiológicas.

A Lina e Eliane pela ajuda nas análises de na droga vegetal.

Aos farmacêuticos, Geovani Pereira, Jamilly Kelly, Gabriela Muniz, Jéssica Ohanna e Andressa Ferreira.

Aos meus amigos Sr. Jota e Sra. Lourdes por me acolher em Campina Grande. Obrigada por todos os conselhos, vocês são exemplos para mim.

A minhas amigas Amanda Almeida, Mércia e Jeudma, mesmo distante fisicamente, sempre arrumavam um jeito de me incentivar.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão desse trabalho.

Em todo o tempo ama o amigo e na  
hora da angústia nasce o irmão.

Provérbios 17:17

## RESUMO

A *Agave sisalana* é uma planta de origem mexicana que se destaca por fornecer a fibra mais dura do mundo: o sisal. No Brasil, essa planta representa uma importante fonte de renda para agricultores de regiões semi-áridas principalmente dos estados da Bahia e Paraíba. A capacidade de gerar empregos está relacionada à manutenção das lavouras, colheita, desfibramento, beneficiamento da fibra, industrialização e confecção de artesanato. O objetivo desse trabalho foi determinar as atividades antimicrobiana, antioxidante e de citotoxicidade da *Agave sisalana* Perrine, em resíduos obtidos da desfibrilação das folhas. Foram utilizados os resíduos líquido (RL-0), líquido seco em spray drying (RL-1), extrato etanólico concentrado bruto do resíduo sólido (EEB-0) e extrato etanólico concentrado bruto seco em spray drier do resíduo sólido (EEB-1). A atividade antibacteriana foi determinada em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e antifúngica em cepa de *Candida albicans*. A atividade antioxidante foi realizada com o método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A citotoxicidade foi verificada em células HeLa utilizando o reagente de proliferação celular composto terrazólico (WST-1). A atividade antibacteriana foi encontrada no RL-0 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) e no EEB-1 (*S. aureus*). A atividade contra *C. albicans* foi encontrada em RL-0, EEB-0 e EEB-1. Os extratos etanólicos apresentam atividade antioxidante. O ensaio de citotoxicidade demonstrou como esperado que o RL-0 é tóxico nas concentrações que apresentaram atividade antimicrobiana. Os extratos RL-1, EEB-0 e EEB-1, mostram viabilidade celular acima do controle positivo (células + DMSO) quando nas concentrações de 5 mg/mL, 1 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram que os resíduos de decorticação de *Agave sisalana*, que atualmente são desperdiçados, podem ser fonte de novos ativos terapêuticos.

**Palavras-chave:** sisal, resíduos de decorticação de agave, DPPH, HeLa, microdiluição, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

*Agave sisalana* is a plant of Mexican origin that is characterized by providing the stiffest fiber in the world: the sisal. In Brazil, this plant is an important source of income for farmers in semi-arid regions mainly in the states of Bahia and Paraíba. The ability to create jobs is related to maintenance of the crops, harvesting, refining, processing fiber, industrialization and production of crafts. The aim of this study was to determine the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity of *Agave sisalana* Perrine in wastes obtained from the leaves of defibrillation. Antibacterial activity was determined against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and against fungi *Candida albicans*. The antioxidant activity was performed with the method of DPPH. The cytotoxicity was detected in HeLa cells using the cell proliferation reagent WST-1. The antibacterial activity was found in RL-0 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) and EEB-1 (*S. aureus*). Activity against *C. albicans* was found in RL-0, EEB-0 and EEB-1. Ethanol extracts have antioxidant activity, this analysis was not performed with liquid waste because they do not solubilized in ethanol. The cytotoxicity assay showed that the RL-0 is toxic at concentrations that have antimicrobial activity. The RL-1, EEB-0 and EEB-1, above extracts showed cell viability of the positive control (cells + DMSO), when the concentrations of 5 mg/ml, 1 mg/ml and 1 mg/mL, respectively. These results demonstrate that *Agave sisalana* can be a source of new therapeutic assets.

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Preparo da curva de calibração para fenóis totais .....	33
Tabela 2. Preparo da curva de calibração para determinação de flavonoides nos extratos de <i>Agave sisalana</i> .....	35
Tabela 3. Preparo da curva de calibração para determinação açúcares totais nos extratos de <i>Agave sisalana</i> .....	36
Tabela 4. Preparo da curva de calibração para determinação de açúcares redutores nos extratos de <i>Agave sisalana</i> .....	38
Tabela 5. Preparo da curva de calibração para saponinas .....	39
Tabela 6. Concentrações dos extratos usados para determinação da CIM .....	41
Tabela 7. Preparo do branco, controle e das amostras .....	42
Tabela 8. Quantificações no RL.....	44
Tabela 9. Quantificações no EEB .....	44

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Processo de desfibrilação da <i>Agave sisalana</i> .....	21
Figura 2. Fibras de sisal secando na cidade de Monteiro-PB.....	22
Figura 3. Curva de calibração de fenóis totais .....	34
Figura 4. Curva de calibração de flavonóides.....	35
Figura 5: Curva de calibração de açúcares totais.....	36
Figura 6. Curva de calibração de açúcares redutores.....	38
Figura 7. Curva de calibração de saponinas.....	39
Figura 8. Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ <i>S. aureus</i> .....	45
Figura 9. Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ <i>E. coli</i> .....	46
Figura 10. Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ <i>P. aeruginosa</i> .....	48
Figura 11. Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ <i>C. albicans</i> .....	49
Figura 12. Placa da análise de citotoxicidade.....	50
Figura 13. Citotoxicidade dos extratos de <i>Agave sisalana</i> . .....	50
Figura 14. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos da <i>A. sisalana</i> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNB	Banco do Nordeste do Brasil
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido dinitro-salicílico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil phenyl-1-picrylhydrazyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEB-0	Extrato Etanólico Bruto
EEB-1	EEB-0 seco em Spray Drying
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LB	Meio de cultura para <i>Escherichia coli</i>
RL-0	Resíduo Líquido
RL-1	RL-0 seco em spray drying
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV- VIS	Ultravioleta visível
WST-1	Reagente de Proliferação Celular

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 Gênero Agave .....	20
2.3 Metabólitos secundários .....	23
2.3.1 Compostos Fenólicos .....	23
2.3.2 Saponinas.....	23
2.4 Atividade antimicrobiana .....	24
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
2.4.4 <i>Candida albicans</i> .....	25
2.5 Estresse oxidativo .....	25
2.5.1 Método do DPPH <sup>+</sup> .....	27
2.6.1 Método do WST-1.....	28
3. OBJETIVOS .....	30
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Coleta da amostra.....	32
4.2 Preparo dos extratos.....	32
4.2.1 Resíduo Líquido:.....	32
4.2.2 Resíduo sólido .....	32
4.3 Quantificação de metabólitos secundários nos extratos de Agave sisalana ....	33
4.3.1 Determinação de Fenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteau / padrão ácido gálico.....	33

4.3.2	Determinação dos flavonóides usando padrão quercetina .....	34
4.3.3	Determinação dos açúcares totais pelo método do fenol ácido .....	35
4.3.4	Determinação dos açúcares redutores/ Padrão Frutose.....	37
4.3.5	Determinação das Saponinas totais utilizando o padrão diosgenina .....	38
4.4	Avaliação das atividades biológicas.....	40
4.4.1	Atividade antimicrobiana.....	40
4.4.2	Citotoxicidade .....	41
4.4.3	Atividade antioxidante.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Screening quantitativo de metabólitos secundários .....	44
5.2	Avaliação das atividades biológicas.....	45
5.2.1	Atividade antimicrobiana.....	45
5.2.2	Citotoxicidade .....	50
5.2.3	Atividade antioxidante.....	52
6.	CONCLUSÃO.....	55
7.	REFERÊNCIAS.....	57

# Introdução

---

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como fonte alternativa de compostos com atividade biológica para tratamento de diferentes enfermidades acompanha a própria história do homem. Em parte, a exploração de culturas vegetais como fonte de substâncias químicas de interesse terapêutico, se deve ao fato de as plantas sintetizarem metabólitos secundários, possíveis candidatos a fármacos, como as saponinas, flavonoides, fenóis e carboidratos (WHO, 2012; RIBEIRO et al., 2013; ZHOU et al., 2014; LUO et al., 2014; LEGUA et al., 2014).

De fato, quer seja baseando-se no uso popular de culturas vegetais, quer seja apoiados por comprovação científica das propriedades medicinais de extratos vegetais, as plantas tem sido avaliadas como fonte potencial para importantes e/ou novos ativos farmacêuticos, eficazes, por exemplo, como agentes antibióticos, anticancerígenos, anti-HIV e antioxidantes (FERNANDES et al., 2014; GURIB-FAKIM et al., 2005; MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013; MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, 2001).

Plantas nativas da região do semiárido ou exóticas cultivadas e amplamente distribuídas no Nordeste do Brasil têm despertado atenção quanto a possibilidade de serem fontes de ativos farmacêuticos. As razões estão relacionadas com a necessidade de se descobrir agentes farmacológicos mais eficazes e, ao mesmo tempo, com o objetivo de agregar valor a estas culturas vegetais que são importantes na economia local. (BOTURA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013)

O gênero *Agave* abrange diversas espécies de interesse cultural, econômico e medicinal. No México encontra-se a maior biodiversidade com 150 espécies das mais de 300 existentes (AHUMADA-SANTOS et al., 2013). No Brasil, a espécie de maior interesse é a *Agave sisalana* por ser dela extraída o sisal, a fibra mais dura do mundo. A produção nacional de sisal está concentrada na região Nordeste, em áreas de clima semiárido, com predomínio de pequenos agricultores de agricultura familiar. Os estados da Bahia e Paraíba são os principais produtores, onde quase um milhão de trabalhadores dependem diretamente do cultivo dessa fibra como única forma de trabalho. Ela é matéria-prima para a produção de cordas, fios, tapetes, vassoura, papel e outros produtos (BOTURA et al., 2013).

A produção do sisal concentra-se no Nordeste, uma das regiões mais pobres do Brasil. Destacam-se os estados da Paraíba e Bahia. Nos locais de plantio,

predomina a agricultura familiar sendo esta forma a principal fonte de renda e emprego. A Agave é um importante agente de fixação do homem na região do semiárido, sendo em alguns locais a única alternativa de cultivo com bons resultados econômicos (LOPES et al, 2012; SCOPEL et al, 2013).

Contudo, a fibra representa de 3 a 5% da folha da *Agave sisalana*. O resíduo proveniente da desfibrilação não é aproveitado. Sabe-se que essa planta é rica em metabólitos secundários responsáveis por algumas atividades biológicas encontradas nesse vegetal (CHEN et al, 2009; BOTURA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Apesar da sua grande importância, econômica e social, o sisal é pouco explorado. A descoberta de uma utilidade para o resíduo pode representar mais uma fonte de renda para os agricultores. As pesquisas para descobertas de novos ativos farmacêuticos podem ser uma alternativa interessante visto que já se conhece algumas atividades deste vegetal, tais como: larvicida, antiulcerosa, anti-helmíntica, antimicrobiana (PIZARRO et al, 1999; CERQUEIRA et al, 2012; BORUTA et al, 2011; SANTOS et al, 2009). Evidencia-se um enorme campo de estudo que pode fortalecer a agricultura do sisal e possibilitar a descoberta de ativos farmacêuticos.

## **Referencial Teórico**

---

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero Agave

A família *Agavaceae* inclui mais de 480 espécies, reunindo plantas herbáceas, árvores e arbustos rizomatosos, com folhas alternas, espiraladas e dispostas em roseta. Ocorrem nos Estados Unidos, na América Central e nas Antilhas, com diversificação maior no México. Entre os diversos gêneros destaca-se o *Agave* com várias espécies de grande importância econômica (LOPES; CUNHA; MARTINS, 2012). Muitas espécies de agave são usadas para diferentes aplicações (alimentos, bebidas, fibras, ornamentações) que contribuem para a sustentabilidade das culturas mesoamericanas (PÉREZ et al., 2013; VALENZUELA-SÁNCHEZ et al., 2006; LOPES; CUNHA; MARTINS, 2012). Algumas espécies têm sido amplamente estudadas em suas propriedades biológicas, como é o caso de *Agave tequilana*, *Agave americana*, *Agave angustifolia*, *Agave salmiana* e *Agave sisalana* (SEMENYA et al., 2012; ZAMORA-GASGA et al., 2014; MORENO-VILET et al., 2014; AHUMADA-SANTOS et al., 2013; BOTURA et al., 2013).

O sisal é a fibra obtida da *Agave sisalana*. Ele é produzido em vários países tais como Quênia, Cuba, Tanzânia, China, Haiti, Madagascar, México e Brasil, sendo esse último o maior produtor e exportador mundial. A produção brasileira da fibra, em 2011, foi de 111.000 toneladas (SILVA et al., 2008; SCOPEL; ANGELO; GREGOLIN, 2013; NAVES, 2012). O cultivo se concentra na região Nordeste, sendo os estados produtores: Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará.

A *Agave sisalana* é uma herbácea monocotiledônea série Liliiflorea, família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*, gênero *Agave*, subgênero *Euagave*. Pelo fato de ser uma planta monocárpica, floresce apenas uma vez, no final do ciclo vegetativo, emitindo o que os agricultores denominam de flecha (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005). Das folhas, através de um processo denominado desfibramento, retira-se o sisal à principal fibra dura produzida no mundo (Figura 1).

**Figura 1.** Processo de desfibrilação da Agave sisalana



Fonte: a autora.

Cada folha contém aproximadamente 1.000 fibras de comprimentos de 50 a 100 cm e de cor creme ou amarelo pálido (SILVA et al,2008). O sisal é uma fibra altamente resistente utilizada para produzir artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft (de alta resistência) e outros tipos de papel fino (para cigarro, filtro, papel dielétrico, absorvente higiênico, fralda etc). Ainda pode ser usada na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, de geotêxteis (para utilização em proteção de encostas, na agricultura e revestimento de estradas), na mistura com polipropileno, em substituição à fibra de vidro, na composição de objetos plásticos e na construção civil (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; ALVES; SANTIAGO, 2006).

O desfibrilamento consiste no processo de eliminação da polpa ou mucilagem que envolve a fibra da folha, mediante uma raspagem mecânica. A principal desfibriladora utilizada pelos agricultores nordestinos ainda é a máquina “Paraibana”, que apresenta baixa capacidade operacional (em torno de 150 a 200kg de fibra seca, em um turno de 10 horas/dia), além de desperdiçar em média 20 a

30% das fibras/folhas e de expor os operadores a constantes riscos de acidentes. Esse, entretanto, é um dos únicos equipamentos disponíveis no mercado brasileiro, de baixo custo aquisitivo e de fácil manutenção(ALVES; SANTIAGO, 2006). Após o desfibramento, as fibras são colocadas ao sol para secar (figura 2).

**Figura 2.** Fibras de sisal secando na cidade de Monteiro-PB



Fonte: a autora.

As fibras do sisal se inserem no grupo das fibras estruturais que tem a função de dá sustentação a rigidez as folhas. Elas estão dispostas em forma de feixes, variando em comprimento desde 40 cm a 2 m (média de 1,2 m)(LI; MAI; YE, 2006). As fibras são rígidas, inflexíveis, com resistência muito superior as demais fibras naturais, além de ter boa durabilidade(SAPUAN et al, 2006) São constituídas, assim como todas as fibras lignocelulósicas, de celulose, hemicelulose, lignina, pectina, cera e substâncias solúveis em água, sendo as três primeiros componentes responsáveis pelas propriedades físicas da fibra(GEORGOPOULOS et al., 2005).

Em geral, o material restante, cerca de 96%, consiste em água, tecido parenquimatoso, celulose, componentes do metabolismo primário e secundário, e compostos inorgânicos(BRANCO et al., 2010).Esse resíduo é utilizado como fertilizante orgânico, suplemento para a alimentação de bovinos e caprinos e como

material na produção de medicamentos (BOTURA et al., 2011; DEBNATH et al., 2010; ALVES; SANTIAGO, 2006).

Além de constituir fonte de renda e emprego, o sisal é agente de fixação do homem à região semi-árida nordestina, sendo, em algumas dessas regiões, a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios a um grande contingente de trabalhadores. Estima-se que mais de 500 mil postos de trabalho são gerados nessa atividade que vai da manutenção das lavouras, colheita, desfibramento, beneficiamento da fibra até a industrialização e confecção de artesanato (MARTIN; SILVA, 2009).

## **2.3 Metabólitos secundários**

### *2.3.1 Compostos Fenólicos*

São moléculas que possuem pelo menos um anel aromático no qual, no mínimo, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES *et al*, 2007). São sintetizados naturalmente pelas plantas. As propriedades antioxidantes de compostos fenólicos são principalmente por causa de suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes doadores de hidrogênio (KAUR; KAPOOR, 2001).

Pertencem a essa classe os fenóis simples, ácidos fenólicos, xantonas, flavonóides, ligninas, xantonas, dentre outros. Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes dessa classe de metabólitos secundários. Trata-se substâncias biossintetizadas a partir da via dos fenilpropanóides, possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados. Estão envolvidos em várias propriedades farmacológicas, tais como: atividade antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral (SIMÕES *et al*, 2007).

### *2.3.2 Saponinas*

São glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Essas substâncias representam interesse farmacêutico por serem adjuvantes em formulações, componentes ativos em drogas vegetais e matéria prima para a síntese de esteroides. Dentre as atividades biológicas podem ser citadas: ação moluscocida, antimicrobiana, inseticida, hemolítica, antiinflamatória, entre outras (FRANCIS *et al.*,

2002; RIBEIRO; COELHO; MARRUCHO, 2013; BOTURA et al., 2013)

### 2.3.3 Carboídratos

São polímeros de alto peso molecular, resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses. Têm grande distribuição na natureza e são constituintes essenciais de todos os organismos vivos. Nas plantas superiores, os carboídratos atuam no processo de reprodução e como proteção durante os períodos de seca(PRAZNIK et al., 2013; ARRIZON et al., 2010;SIMÕES et al, 2007).

Alguns carboídratos possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes. Eles são chamados de açúcares redutores, trata-se dos monossacarídeos frutose e glicose(DEMIATE et al, 2002;SIMÕES et al, 2007).

## 2.4Atividade antimicrobiana

### 2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Embora seja da microbiota normal, o *S. aureus* é uma bactéria patogênica, gram positiva, que atua em uma ampla gama de infecções. É um importante agente patogênico humano que causa uma ampla variedade de doenças, desde infecções da pele e dos tecidos moles até doenças graves, tais como pneumonia, síndrome de choque tóxico, bacteremia e endocardite. A morbimortalidade associadas à infecções por *S. aureus* permanece levada devido, em parte, capacidade dessa bactéria desenvolver resistência a praticamente todos os antibióticos, incluindo vancomicina(LIU et al., 2014).

### 2.4.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa presente no trato intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria das cepas são comensais, porém algumas linhagens apresentam grande virulência podendo causar várias manifestações clínicas como: diarreia, infecção urinária, meningite e septicemia. Esse microrganismo acarreta doenças diarreias agudas e persistentes,

especialmente em lactantes, podendo levar à morte. É transmitido através do consumo de água e alimentos contaminados (REBELLO; REGUA-MANGIA, 2014) (WHO 2011).

#### 2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

São bacilos gram negativos oportunistas responsáveis pela maioria da infecções nosocomiais e, em alguns casos, a principal causa de morte. Apresenta dificuldades de tratamento devido a múltiplas resistências a antibacterianos, sendo disponível poucos fármacos efetivos contra esse microrganismo. A resistência pode ser natural ou adquirida através da troca de material genético (HE et al., 2014; NEVES, 2011; STOVER et al., 2000)

#### 2.4.4 *Candida albicans*

É uma levedura presente na flora normal, principalmente, dos tratos gastrointestinal e genitourinário dos seres humanos, tornando-se um patógeno oportunista em imunocomprometidos. Geralmente são sensíveis a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, porém existem relatos de resistência adquirida em pacientes que usam prolongadamente os fármacos da classe dos antifúngicos azóis (BERMAN; SUDBERY, 2002; CHANG et al., 2014; SILVA, 2006)

### 2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre as espécies ativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes, e está relacionado ao surgimento de várias enfermidades, tais como: doenças cardiovasculares, degeneração neuronal como Alzheimer e Parkinson, câncer, reumatismo, doenças autoimunes, envelhecimento precoce, diabetes *mellitus*, doenças inflamatórias. Antioxidantes têm sido relatados para desempenhar um papel importante bloqueando esse estresse induzido por radicais livres (TABARAKI; NATEGHI; AHMADY-ASBCHIN, 2013; KAUR; KAPOOR, 2001; YOUNG, 2001; FU et al., 2014; SINDHI et al., 2013).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas e instáveis energizadas tendo elétrons desemparelhados. Podem ser formados naturalmente durante o

metabolismo e/ou pelo sistema imunológico, que cria essas espécies com o intuito de mediar a sinalização celular no combate a vírus e bactérias. No entanto, fatores ambientais como poluição, radiação, fumaça de cigarro, herbicidas, fadiga excessiva, ingestão de álcool e dietas ricas em gordura, também podem gerar radicais livres em excesso causando sérios danos celulares (KAUR; KAPOOR, 2001; FU et al., 2014).

O oxigênio é o principal elemento que desencadeia o processo de formação desses radicais. Os radicais livres reagem rapidamente com outros compostos, tentando capturar os elétrons necessários para obter a estabilidade. O dano oxidativo ocorre por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, tais como: radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), radical peroxil ( $\text{OOR}^\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (SINDHI et al., 2013).

Geralmente esses radicais atacam moléculas estáveis mais próximas, “roubando” seus elétrons. A molécula atacada perde seu elétron e torna-se um radical livre em si, iniciando uma reação em cadeia. Uma vez que o processo é iniciado, ele provoca a peroxidação lipídica que resulta na desestabilização e desintegração de membranas celulares ou de oxidação de outros componentes celulares tais como proteínas e DNA. O cérebro é particularmente vulnerável à lesão oxidativa, devido à sua alta taxa metabólica e níveis elevados de lipídios poliinsaturados, o alvo da peroxidação lipídica (FU et al., 2014)

O próprio organismo tem meios para interromper esse processo, tais como os antioxidantes, que são substâncias que, em baixas concentrações, atrasam a oxidação de proteínas, hidratos de carbono, lipídios e DNA. Eles neutralizam os radicais livres doando um de seus próprios elétrons, sem no entanto se converterem em radicais livres. Dentre os principais antioxidantes endógenos, destacam-se as enzimas superóxido dismutases, catalases e glutatona peroxidase (KAUR; KAPOOR, 2001; SINDHI et al., 2013).

Os antioxidantes exógenos, por sua vez, podem ser adquiridos na dieta diretamente de frutas e vegetais frescos. São ricos em flavonóides e suplementos antioxidantes que contribuem para a proteção contra efeitos dos radicais livres. Eles desempenham um papel tanto no corpo humano, para reduzir os processos oxidativos, como nos alimentos retardando a peroxidação lipídica, ajudando assim manter sabor, textura e cor do produto alimentar durante armazenamento (SINDHI et al., 2013).

Podem ser usados no tratamento de lesões cerebrais e doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer, de Parkinson, e esclerose lateral amiotrófica, ou ainda como uma forma de prevenir a perda auditiva induzida por ruído. Os chamados antioxidantes naturais, obtidos a partir de alimentos, tais como a vitamina C, podem ser utilizados como alternativas aos antioxidantes sintéticos (SINDHI et al., 2013).

### 2.5.1 Método do DPPH\*

Essa técnica foi descrita pela primeira vez por Blois em 1958. O DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é um radical livre estável que apresenta uma cor púrpura escura e absorção no intervalo de 515-520 nm. Ele reage com os compostos que podem doar um átomo de hidrogênio. Esse método baseia-se na eliminação de DPPH através da adição de uma espécie ou um radical antioxidante. À medida que ocorre redução, o DPPH fica cor amarelo pálido, é possível determinar a atividade antioxidante por espectrofotômetro. Quanto maior a capacidade de eliminação de radicais livres de um composto antioxidante, mais redução de DPPH e menos cor púrpura existe na amostra. É o ensaio mais utilizado por ser simples, eficiente e barato (JIMÉNEZ et al., 2014; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

## 2.6 Toxicidade

A toxicidade limita a liberação e o uso de fármacos. Estudos de toxicidade servem de indicador para a condução de estudos pré-clínicos e devem ser realizados em células e posteriormente em animais (MARTINS et al, 2009).

A análise de citotoxicidade permite a avaliação da atividade celular em meio controlado na presença de uma substância em teste. Mudanças como a redução da função mitocondrial, alterações morfológicas e de replicação, são os eventos observados nos testes, porém a modificação da função mitocondrial é a resposta mais comum como indicadora de citotoxicidade (MARTINS et al, 2009;

As células HeLa são oriundas de um tumor da cérvix uterina humana. Receberam essa designação porque foram retiradas de uma paciente com tumor cervical, chamada Henrietta Lacks, de 30 anos. São genética e morfologicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de

ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura (PUCK, T. T.; MARCUS, 1955; MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

Os meios de cultura são suplementados com 5 a 20% de soro fetal. As células necessitam de fatores de crescimento, hormônios, proteínas, lipídios e outras substâncias que podem ser supridas por esse fluido animal. Atualmente os soros mais utilizados são os de origem bovina, de cavalo e humano (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

### *2.6.1 Método do WST-1*

É uma técnica colorimétrica não radioativa usada para quantificar proliferação celular, viabilidade e citotoxicidade presente em substâncias ou formulações. O WST-1 é um sal solúvel em água que, quando adicionado ao meio de cultura, é clivado pelas células viáveis. O sal de tetrazólio é reduzido a uma substância chamada de formazan, indicando a viabilidade celular, ou seja, a quantidade de formazan formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O ensaio é realizado em placa de 96 poços e a leitura é efetuada, geralmente, em ELISA (NGAMWONGSATIT et al., 2008; TAN; BERRIDGE, 2000).

# Objetivos

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Determinar as atividade antimicrobiana, antioxidante e de citotoxicidade de produtos extraídos da *Agave sisalana* Perrine.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Processar os resíduos obtidos da decorticação de *A.sisalana*
- Quantificar metabólitos secundários dos resíduos de *A.sisalana*;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos resíduos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.
- Aplicar o método do DPPH para avaliação da atividade antioxidante;
- Classificar os extratos quanto a toxicidade em células HeLa.

## **Metodologia**

---

## 4.METODOLOGIA

### 4.1 Coleta da amostra

A *Agave sisalana* foi coletada no município de Monteiro-PB, Brasil, (7°52'40.50" S e 37°07'34.91" W) em janeiro de 2013 na fazenda experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A exsicata foi depositada no Herbário Manoel de Arruda Câmara da Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil, sob o número 210. Foram retiradas folhas de plantas com 6 anos de idade. O resíduo, coletado da desfibrilação das folhas na máquina paraibana, foi prensado manualmente sendo assim dividido em resíduo líquido (suco) e resíduo sólido (bagaço).

### 4.2 Preparo dos extratos

#### 4.2.1 Resíduo Líquido:

Após prensa manual do resíduo da desfibrilação, o líquido (suco) resultante foi chamado de Resíduo Líquido 0 (RL-0). Essa amostra (2,36 L) foi submetida à secagem por spray drying (MSD 0,5, Ribeirão Preto, SP, Brasil) nas seguintes condições: bico de pulverização com um diâmetro de entrada de 1,0 mm, bomba de regulação de 0,3 L/h, fluxo de ar de atomização de 40 L/min, configuração do aspirador de 3,8 m<sup>3</sup>/min e temperatura de entrada de 70 ± 2 °C. O pó obtido (137,682g) foi chamado de Resíduo Líquido 1 (RL-1).

#### 4.2.2 Resíduo sólido

O bagaço foi seco em estufa de circulação de ar a 40°C e moído em moinho de facas. O pó, resultante, foi submetido à maceração com etanol 96% na proporção de 1:5 (droga vegetal:álcool 96°). Foram usados 2,25 Kg de droga vegetal e obteve-se 215,37g de Extrato Etanólico Bruto (EEB-0). Esse produto foi suspenso em água e seco no spray drying, rendendo 24,30g.

### 4.3 Quantificação de metabólitos secundários nos extratos de *Agave sisalana*

#### 4.3.1 Determinação de Fenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteau / padrão ácido gálico

Para determinar a concentração de fenóis totais procedeu-se da seguinte forma: foi retirada uma amostra de 0,50 mL do extrato, diluído em água. A este volume foi acrescido 2,5 mL de Folin Ciocalteau 10% e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%, totalizando 5,0 mL correspondentes a cada ensaio em tubo de ensaio. Esta mistura foi mantida em banho de água a uma temperatura de 50 °C por 5 minutos. Foi feito isso para os 4 extratos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente sendo em seguida realizada a medida da absorbância a 760 nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expressa em mg/g de equivalente ácido gálico. Procedeu-se de forma semelhante com as soluções-padrão de ácido gálico (curva de calibração) e com o branco, neste, ao invés de colocar extrato, foi colocado 0,5 mL de água destilada (AMORIM; QUEIROZ; AFONSO, 2002; ORDONEZ et al., 2006).

##### 4.3.1.1 Curva de calibração fenóis totais

A curva de calibração foi preparada a partir das medidas de absorbância da solução aquosa de ácido gálico nas concentrações 5, 10, 20, 40, e 80 µg por 0,5 mL, ver Tabela 1. A este volume foram acrescentados 2,5 mL de Folin Ciocalteau 10% e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%, totalizando 5,0 mL correspondentes a cada ensaio. Esta mistura foi mantida em banho de água a uma temperatura de 50°C por 5 minutos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente sendo em seguida realizadas as medidas da absorbância a 760 nm contra um branco de água.

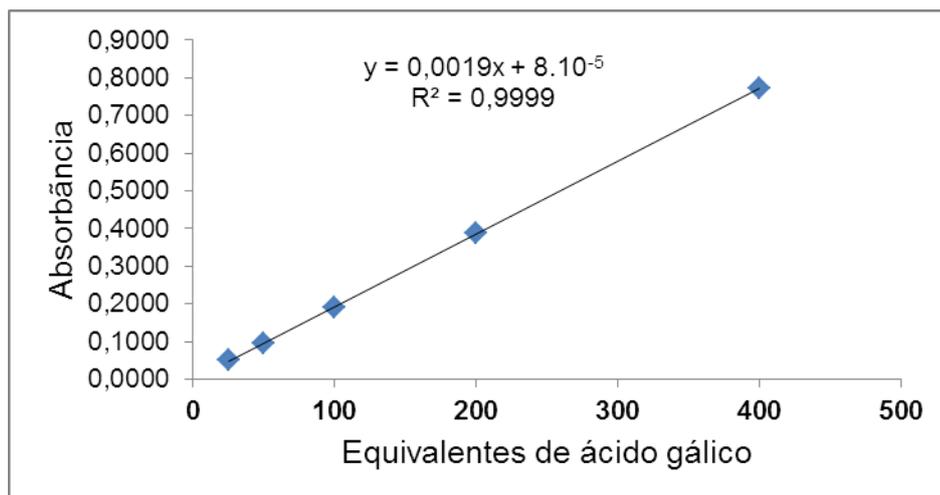
**Tabela 1.** Preparo da curva de calibração para fenóis totais

Tubos	Diluição para volume final de 500 µL			Folin Ciocalteau 10%	Carbonato de sódio 7,5%
	Solução-mãe de ácido gálico de 100 µg/mL	Água	Concentração de leitura		
1	25µL	475	5 µg/mL	2,5 mL	2,0mL

2	50 µL	450	10 µg/mL	2,5mL	2,0mL
3	100 µL	400	20 µg/mL	2,5 mL	2,0 mL
4	200µL	300	40 µg/mL	2,5 mL	2,0 mL
5	400 µL	100	80 µg/mL	2,5 mL	2,0 mL
6	800 µL	200	160 µg/mL	2,5 mL	2,0 mL

Para calcular a quantidade de fenóis foi usada a equação obtida a partir da curva de calibração:  $Y = 0,0019x + 8.10^{-5}$ ,  $R^2 = 0,9999$ , em que x é a absorbância e Y é o equivalente de ácido gálico, ver figura 3.

**Figura 3.** Curva de calibração de fenóis totais



#### 4.3.2 Determinação dos flavonóides usando padrão quercetina

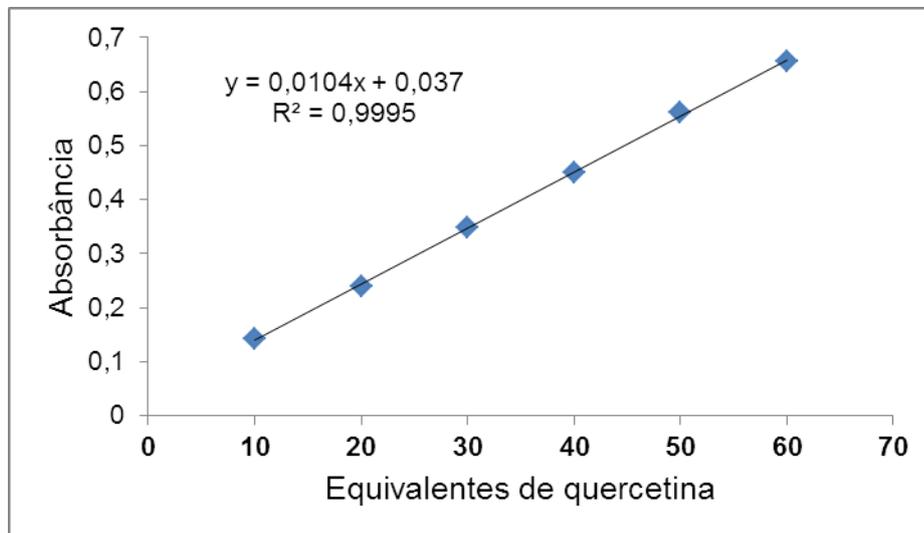
Para determinar a quantidade de flavonoides procedeu-se da seguinte forma: um volume de 0,5 mL de solução de  $AlCl_3$  a 2% em etanol foi adicionado a 0,5 mL do extrato. A mistura resultante foi incubada durante 1 h, para o desenvolvimento de cor amarela o que indica a presença de flavonoides. A absorbância foi medida a 420 nm, utilizando espectrofotometria de UV-VIS. O teor de flavonoides total foi calculado como de equivalentes quercetina (mg/g). Para o branco, ao invés de colocar extrato, foi colocado 0,5 mL de água destilada (ORDONEZ et al., 2006). Os dados do preparo da curva de calibração podem ser vistos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Preparo da curva de calibração para determinação de flavonoides nos extratos de *Agave sisalana*

Tubos	Diluição para volume final de 2 mL			Cloreto de alumínio 2 %
	Solução-mãe quercetina de 100 µg/mL	Água	Concentração de leitura	
1	200 µL	450	10 µg/mL	2 mL
2	400 µL	400	20 µg/mL	2 mL
3	600 µL	350	30 µg/mL	2 mL
4	800 µL	300	40 µg/mL	2 mL
5	1000 µL	250	50 µg/mL	2 mL
6	1200 µL	200	60 µg/mL	2 mL

O cálculo da quantidade de flavonoides foi feito utilizando a equação ( $Y = 0,0114x$ ,  $R^2 = 0,9995$ ) obtida a partir da curva de calibração. O  $x$  representa a absorbância e  $Y$  é o equivalente quercetina. Ver Figura 4.

**Figura 4.** Curva de calibração de flavonóides



#### 4.3.3 Determinação dos açúcares totais pelo método do fenol ácido

Para determinação de açúcares totais precedeu-se da seguinte forma: Foi adicionado 1 mL do extrato a 1 mL de fenol 5% e, rapidamente, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Isso foi feito com os 4 extratos. Como a reação é exotérmica,

só após as amostras ficarem com temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorbância em 490 nm. Para o branco, ao invés de colocar extrato, foi colocado 1 mL de água destilada. (DEMIATE; WOSIACKI, CZELUSNIAK; NOGUEIRA, 2002).

*Curva de calibração para açúcares totais*

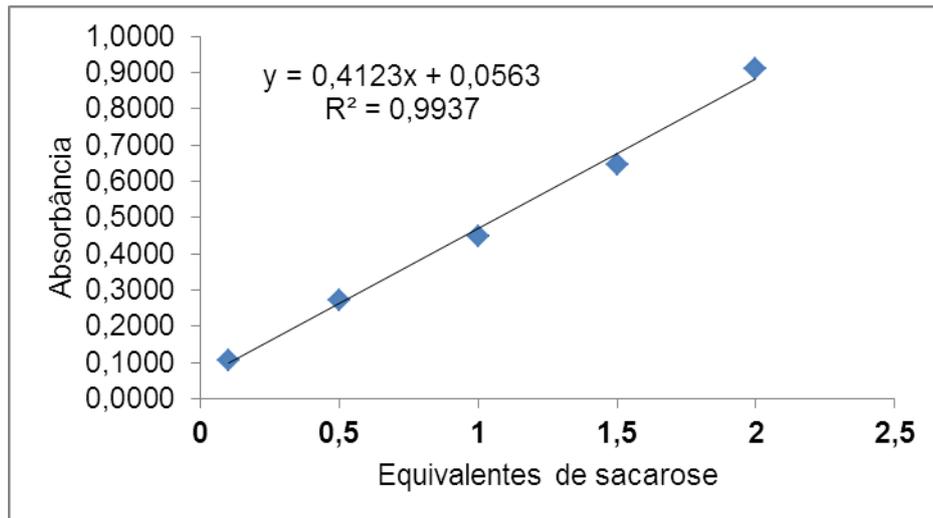
Para realizar a curva de calibração foram colocados em tudo de ensaio: água, solução mãe, fenol 5% e o ácido sulfúrico concentrado, conforme consta na Tabela 3. Após ficarem em temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em banho-maria a 30°C por 20 min. A leitura foi feita no comprimento de onda de 490nm.

**Tabela 3.** Preparo da curva de calibração para determinação açúcares totais nos extratos de *Agave sisalana*

Tubos	Diluição para volume final de 1mL			Fenol	Ácido sulfúrico
	Solução-mãe de sacarose 1mg / ml	Água	Concentração de leitura		
1	0,01	0,99	10 µg/mL	1 mL	5 mL
2	0,03	0,97	30 µg/mL	1 mL	5 mL
3	0,05	0,95	50 µg/mL	1mL	5 mL
4	0,07	0,93	70 µg/mL	1mL	5 mL
5	0,1	0,90	100 µg/mL	1 mL	5 mL

O cálculo da quantidade de açúcares totais foi feito utilizando a equação obtida a partir da curva de calibração:  $Y = 0,4123x + 0,0563$   $R^2 = 0,9937$ , onde x é a absorbância e Y é o equivalente de sacarose. Ver Figura 5.

**Figura 5:** Curva de calibração de açúcares totais



#### 4.3.4 Determinação dos açúcares redutores/ Padrão Frutose

Na determinação dos açúcares redutores utilizou-se o seguinte procedimento: adicionou-se 0,5 mL do extrato a 0,5 mL do reagente DNS em tudo de ensaio. Após agitar em vórtex, a mistura foi incubada em banho-maria a 100 °C durante 5 minutos. Deixou-se esfriar a temperatura ambiente e o volume foi completado para 5 mL com água destilada, agitou-se em vórtex. (ARRIZON et al., 2010). Para o branco, ao invés de colocar extrato, foi colocado 0,5 mL de água destilada.

#### Preparo do DNS

O reagente DNS foi preparado da seguinte forma: 10 g de DNS e 300 g de tartarato de sódio e potássio foram dissolvidos em 800 mL de NaOH a 0,5 N que foi levemente aquecido para dissolver os reagentes. O volume foi completado para 1 L com água destilada.

#### Curva de calibração para açúcares redutores

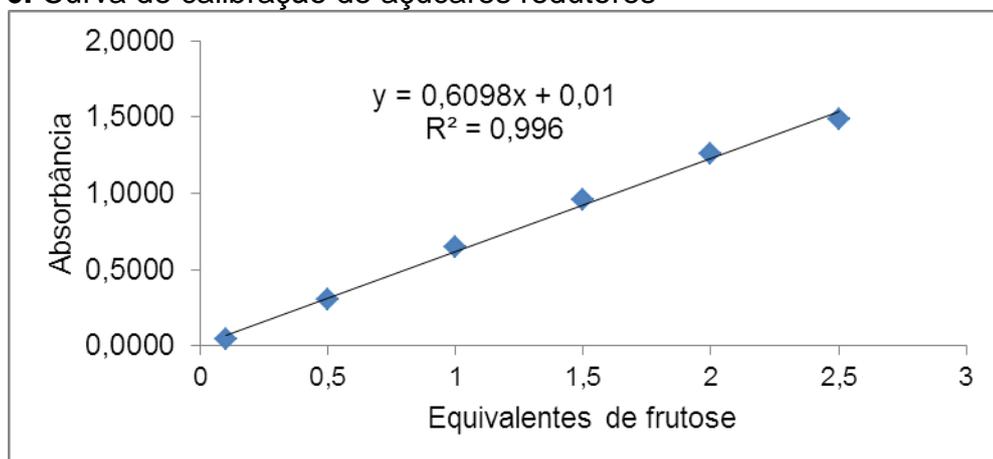
Para realizar a curva de calibração, procedeu-se conforme tabela 4. Foram acrescentados em tudo de ensaio a solução mãe, a água e o reagente DNS. Essa mistura foi agitada e incubada em banho-maria a 100 °C durante 5 minutos. Ao esfriar em temperatura ambiente, o volume foi completado para 5 mL com água destilada. Agitou-se em vórtex e a leitura foi feita em 540nm no espectrofotômetro UV (ARRIZON et al., 2010)

**Tabela 4.** Preparo da curva de calibração para determinação de açúcares redutores nos extratos de *Agave sisalana*

Tubos	Diluição para volume final de 0,5 mL			Reagente DNS	Água
	Solução mãe de frutose 5mg/mL	Água	Concentração de leitura		
1	0,01 mL	0,49 mL	0,1 mg/mL	0,5 mL	4 mL
2	0,05 mL	0,45 mL	0,5 mg/mL	0,5 mL	4 mL
3	0,1 mL	0,4 mL	1,0 mg/mL	0,5 mL	4 mL
4	0,15 mL	0,35 mL	1,5 mg/mL	0,5 mL	4 mL
5	0,2 mL	0,3 mL	2,0 mg/mL	0,5 mL	4 mL
6	0,25 mL	0,25 mL	2,5 mg/mL	0,5 mL	4 mL

O cálculo da quantidade de açúcares redutores foi feito utilizando a equação obtida a partir da curva de calibração:  $Y=0,6098x+0,01$   $R^2 = 0,996$ , onde x é a absorbância e Y é o equivalente de frutose. Ver figura 6.

**Figura 6.** Curva de calibração de açúcares redutores



#### 4.3.5 Determinação das Saponinas totais utilizando o padrão diosgenina

Para determinar a quantidade de saponinas, procedeu-se da seguinte forma: adicionou-se 0,25 ml de extrato, 0,25 mL de vanilina 8 % e em seguida, 2,5 mL de 72% (v/v) de ácido sulfúrico lentamente pelas paredes do tubo de ensaio. Após misturar bem, os tubos foram transferidos para banho-maria a 60 ° C. Depois de 10 minutos, os tubos foram arrefecidos em banho de gelo e água fria durante 3-4 min.

Em seguida, procedeu-se a leitura das absorvâncias em 544 nm. Para o branco, ao invés de colocar extrato, foi colocado 0,25 mL de água destilada.

*Curva de calibração para saponinas*

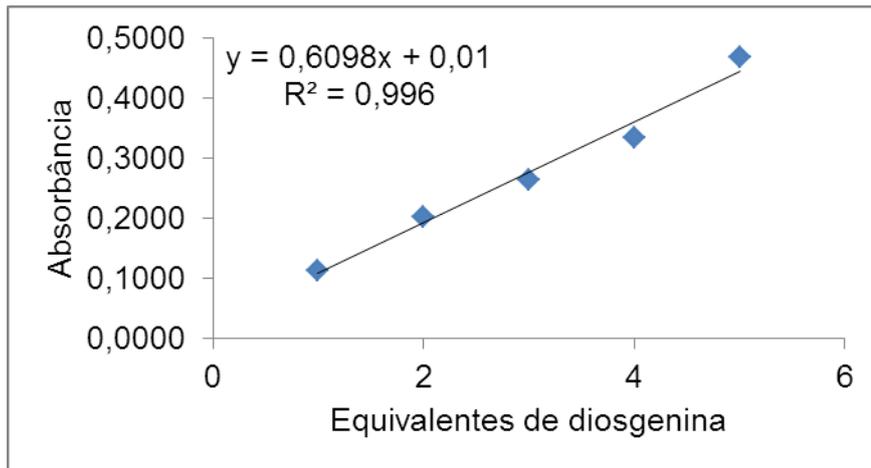
A vanilina a 8% foi preparada em etanol a 99,5% (grau analítico). O ácido sulfúrico 72% foi preparado em água destilada. A solução mãe de diosgenina foi feita em uma concentração de 0,5 mg/mL em metanol. As quantidades de cada solução foram feitas conforme a Tabela 5.

**Tabela 5.** Preparo da curva de calibração para saponinas

Tubos	Diluição para volume final de 0,25 mL			Vanilina reagente (8%)	Ácido sulfúrico 72%
	Solução-mãe de diosgenina 0,5mg/mL	Metanol	Concentração de leitura		
1	50 µL	200	100 µg/mL	0,25 mL	2,5mL
2	100 µL	150	200 µg/mL	0,25 mL	2,5mL
3	150 µL	100	300 µg/mL	0,25 mL	2,5mL
4	200 µL	50	400 µg/mL	0,25 mL	2,5mL
5	250 µL	0	500 µg/mL	0,25 mL	2,5mL

O cálculo da quantidade de saponinas foi feito utilizando a equação obtida a partir da curva de calibração:  $Y=0,6098x+0,01$   
 $R^2 = 0,996$ , onde x é a absorvância e Y é o equivalente de diosgenina. Ver figura 7.

**Figura 7.** Curva de calibração de saponinas



#### 4.4 Avaliação das atividades biológicas

##### 4.4.1 Atividade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em placa de micro diluição, em meio de cultura específico: *Staphylococcus aureus*(ATCC 10390)e *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 9721)foi o TSB (Tryptic Soy Broth), *Escherichia coli*(ATCC 25922) o LB (Difco™ LB Broth), *Candida albicans*(ATCC10231) o Sabouraud (Difco™ Sabouraud Dextrose Broth)(AMARAL et al., 2014).Os extratos foram solubilizados no próprio meio de cultivo.

##### Preparo dos microrganismos

As soluções-mãe de cada bactéria foram preparadas a partir de culturas reserva que estavam armazenadas a 4°C. Colocou-se 1 mL dessa cultura em 25 mL de meio de cultivo (para *S. aureuseP. aeruginosa*foi o TSB e para *E. coli* foi o LB), incubou-se por cerca de 4h até o meio ficasse turvo. Após obter a solução mãe, foram feitas sucessivas diluições e estas foram semeadas em placa de petri. Essas placas foram incubadas em estufa de circulação de ar a 35°C por 24h. Em seguidas as colônias foram contadas. Considerou-se placas que estivessem com números de colônias entre 30 a 300 UFC/mL. A diluição escolhida para o ensaio foi a que continha 10<sup>6</sup> UFC/mL.

As concentrações dos extratos usadas nos ensaios estão especificadas na tabela 6.

**Tabela 6.** Concentrações dos extratos usados para determinação da CIM

	<b>RL-0</b>	<b>RL-1</b>	<b>EEB-0</b>	<b>EEB-1</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	200 µL/mL	45 mg/mL	24 mg/mL	26 mg/mL
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	200 µL/mL	45 mg/mL	24 mg/mL	26 mg/mL
<b><i>E. coli</i></b>	200 µL/mL	49 mg/mL	22 mg/mL	18 mg/mL
<b><i>C. albicans</i></b>	200 µL/mL	2 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL

No controle negativo não foi adicionado o microrganismo e no controle positivo não se acrescentou extrato. Após o período de incubação, 24h em estufa a 25°C, foi retirado 5 µL de cada poço e transferido para uma placa de petri com 2% de Agar Agar type I juntamente com o meio de cultura correspondente, logo após a placa foi incubada em estufa (25°C por 24h) e depois efetuada a leitura. Os testes foram feitos em triplicata.

#### 4.4.2 Citotoxicidade

Esse ensaio foi feito utilizando o Reagente de Proliferação Celular WST-1 (Roche Applied Science). As células HeLa crescidas até ~80% de confluência em placa de 96 poços. Cada poço continha 100 µL de meio F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram encubadas por 48h em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após isso o meio foi substituído e foram adicionados 10 µL de amostra por poço. O experimento foi feito em triplicata. Controles:

- Controle negativo: apenas as células com 10uL de água (amostras preparadas em água)
- Controle positivo: células + 10 µL de DMSO.

As células foram incubadas por 21 horas com os produtos, após esse período: o meio foi substituído, e adicionou-se 10 µL WST-1, após 1 h de incubação seguiu-se à leitura em ELISA (440 nm)(FAVARO et al., 2014).

#### 4.4.3 Atividade antioxidante

Atividade antioxidante foi avaliada segundo o método do DPPH adaptado de Zhang, Liu e Lin(2014). As amostras de EEB-0 e EEB-1 foram diluídas em álcool etílico 96°GL em concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL. O padrão foi o ácido ascórbico e este também foi utilizado nas mesmas concentrações dos extratos. A leitura foi feita em 530 nm. Foi utilizada uma solução de DPPH a 100µg/mL em etanol PA. O branco, o controle e as amostras foram preparados de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7.** Preparo do branco, controle e das amostras

	<b>Alíquota</b>	<b>Diluição em etanol</b>
<b>BRANCO</b>	100 µL da solução de amostra	100 µL e etanol PA
<b>CONTROLE</b>	100 µL da solução de DPPH	100 µL e etanol PA
<b>AMOSTRA</b>	100 µL da solução de amostra	100 µL da solução de DPPH

Para cada concentração usada foi feito um branco correspondente. Após obter as absorbâncias a seguinte equação foi utilizada para obter os valores da atividade antioxidante:

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(A_{amostra} - A_{branco})}{A_{controle}} \right] * 100$$

## **Resultados e Discussão**

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Screening quantitativo de metabólitos secundários

Os resultados das quantificações dos metabólitos secundários podem ser vistas nas Tabelas 8 e 9. Essas substâncias desempenham diversas funções nos vegetais. Em relação às atividades biológicas, vários autores justificam as ações encontradas a esses compostos. Aos fenóis e flavonoides são atribuídos efeitos antioxidantes. As saponinas podem ser anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais, tensoativas e outras ações. Os açúcares podem ser utilizados na alimentação e podem ter propriedades antioxidantes (AGATI et al., 2012; LIU et al., 2013; BITENCOURT et al., 2014; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; WHITTAKER et al., 2009).

**Tabela 8.** Quantificações no RL

	RL-0	RL-1
<b>Fenóis Totais</b>	15,5824 ± 0,4019	268,9052 ± 2,4118
<b>Flavonóides</b>	0,4324 ± 0,0037	14,4871 ± 0,1110
<b>Saponinas</b>	0,0947 ± 0,0068	1,9363 ± 0,0958
<b>Açúcares Totais</b>	0,0530 ± 0,0045	1,6017 ± 0,1147
<b>Açúcares Redutores</b>	2,2096 ± 0,0946	43,2678 ± 0,1110

**Tabela 9.** Quantificações no EEB

	EEB-0	EEB-1
<b>Fenóis Totais</b>	73,4666 ± 2,4872	123,6421 ± 0,9116
<b>Flavonóides</b>	100,9358 ± 5,6341	138,4615 ± 15,4749
<b>Saponinas</b>	8,0302 ± 0,1793	0,0519 ± 0,0011
<b>Açúcares Totais</b>	0,0370 ± 0,0025	0,0519 ± 0,0011
<b>Açúcares Redutores</b>	35,7142 ± 0,7935	51,9345 ± 1,1547

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade ou estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, radiação UV, herbivoria, estímulo mecânico, poluição atmosférica

e ataque de patógenos podem influenciar na quantidade e natureza dos metabólitos secundários das plantas. Variações nesses parâmetros podem interferir em quase todos os metabólitos, como óleos essenciais, fenóis, flavonoides, taninos, saponinas, alcalóides, entre outros. São esses compostos que, isolados ou em conjunto, promovem a atividade biológica (BENAVIDEZ ROZO et al., 2014; DARROW; DEANE BOWERS, 1997; LINDROTH; HSIA; SCRIBER, 1987).

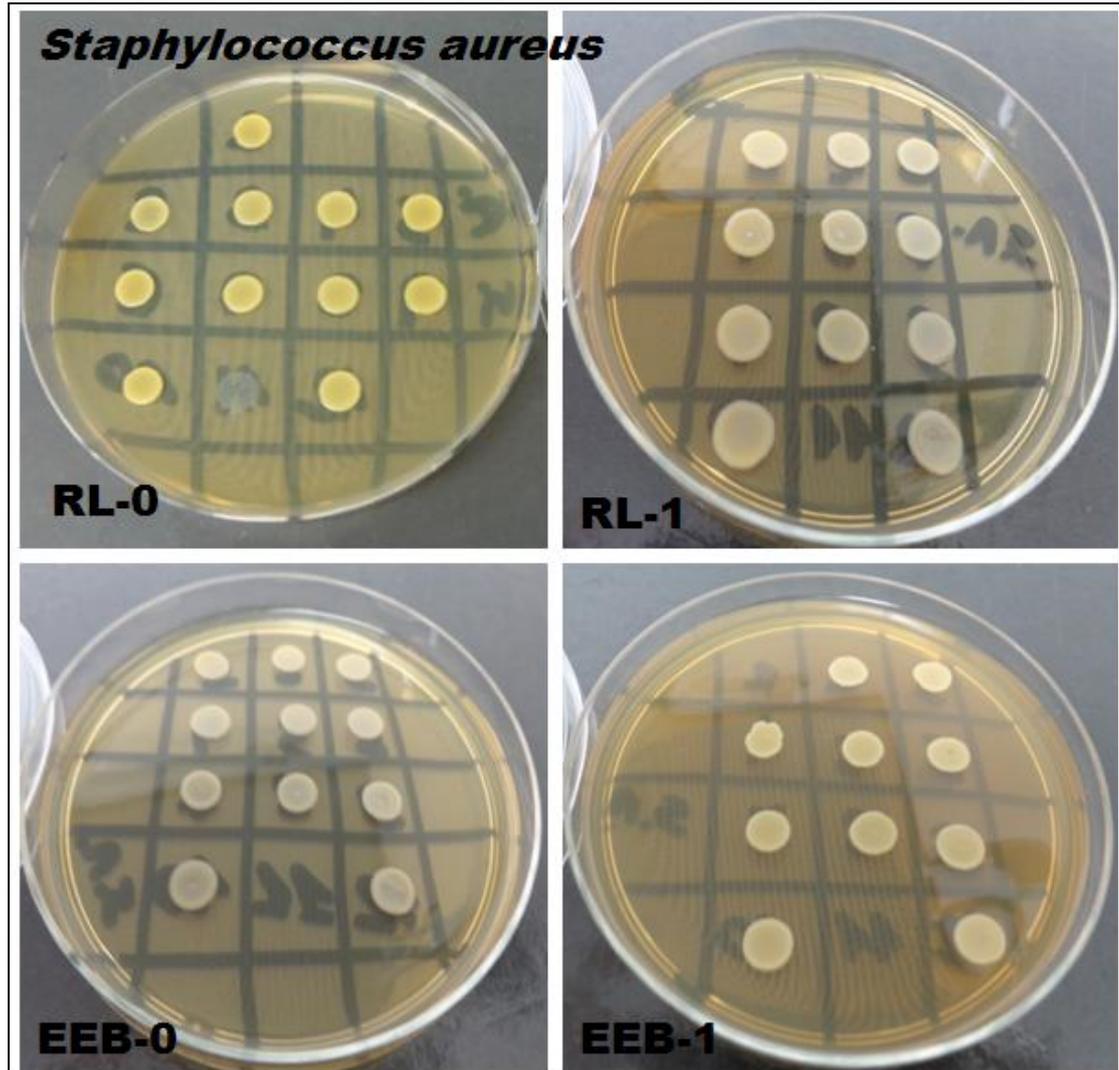
## **5.2 Avaliação das atividades biológicas**

### *5.2.1 Atividade antimicrobiana*

A atividade antibacteriana foi investigada frente a três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados são apresentados nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente. A atividade contra *Candida albicans* pode ser vista na Figura 11.

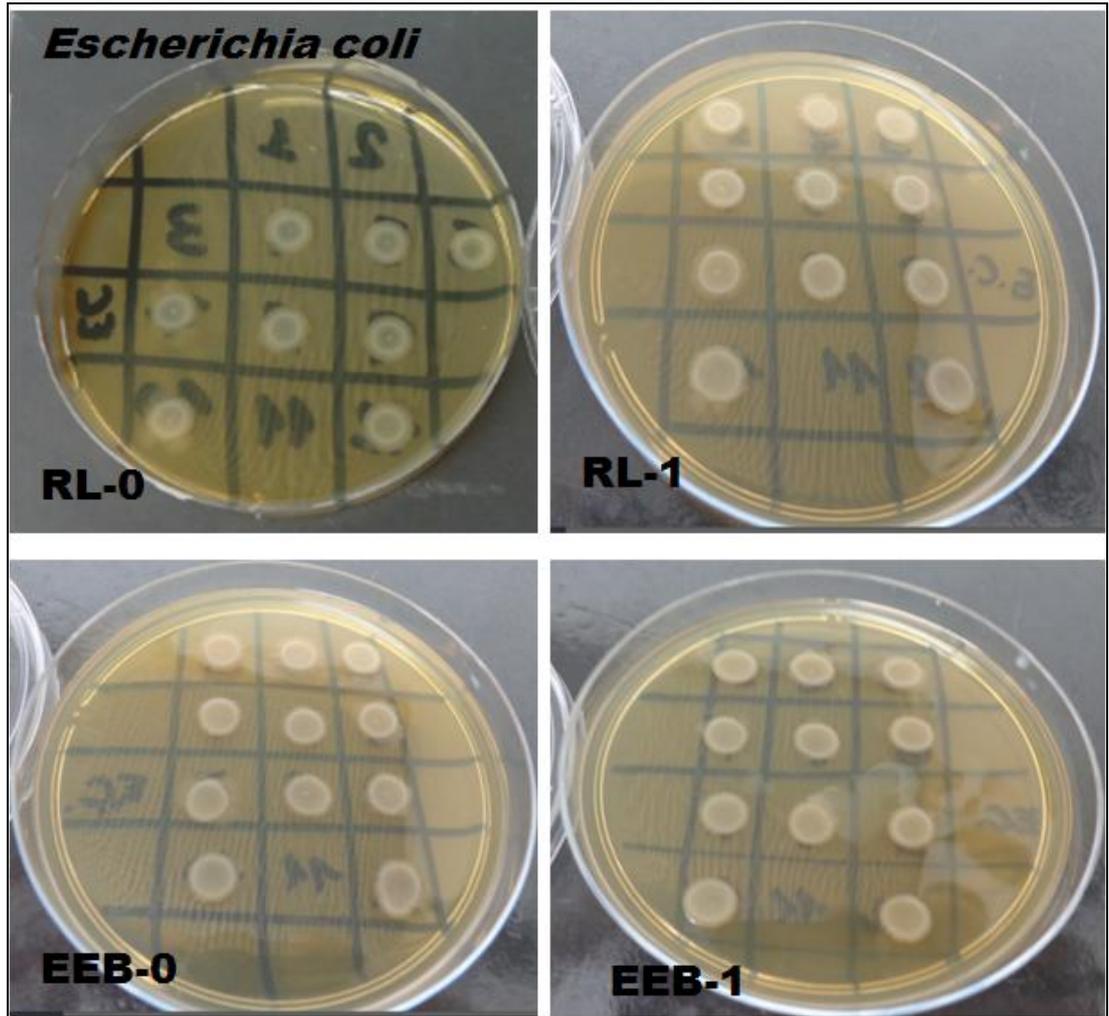
- *Staphylococcus aureus*:

**Figura 8.** Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ *S. aureus*



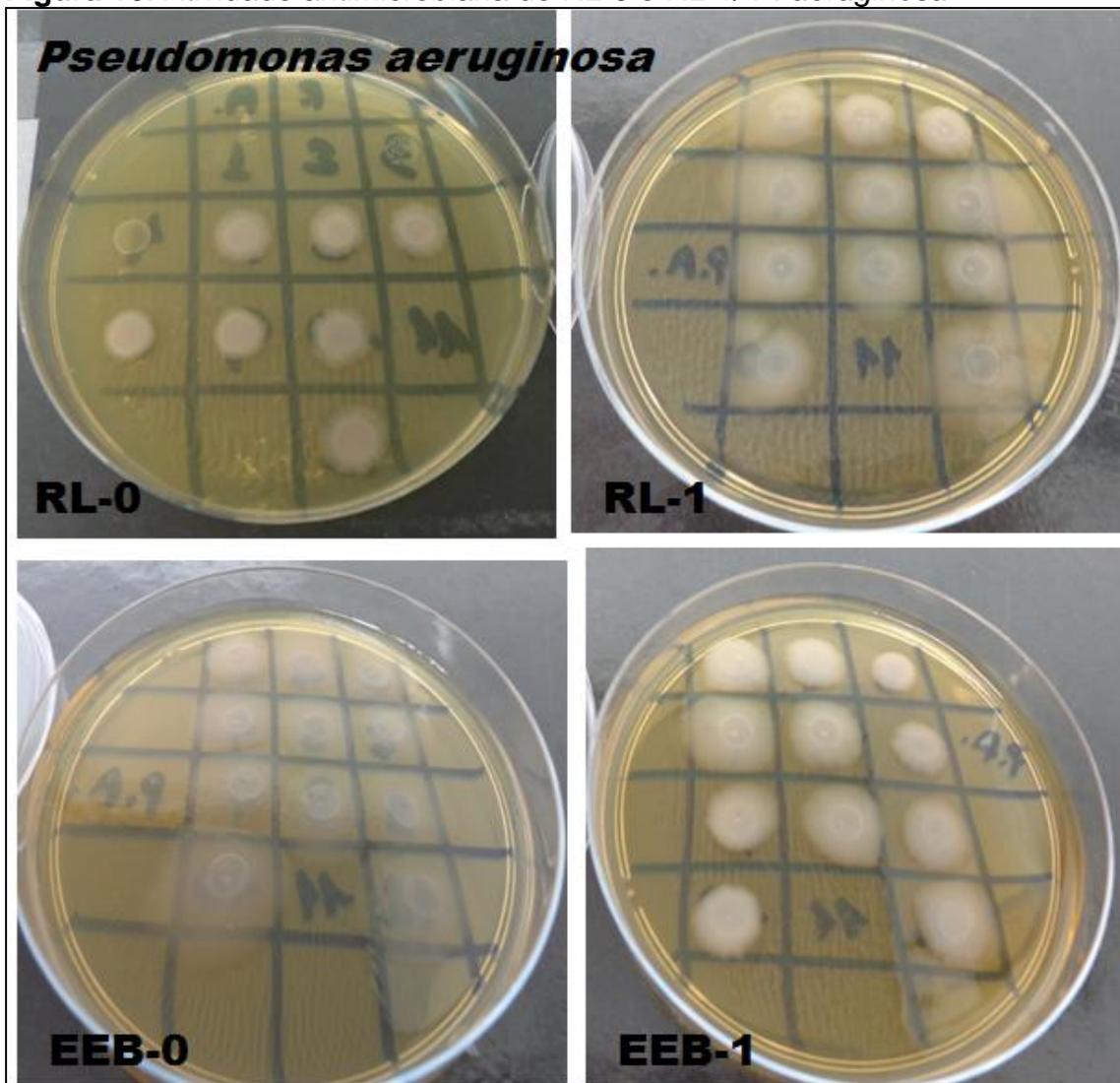
RL-0 foi usado puro e não apresentou atividade. RL-1, EEB-0 e EEB-1 foram usados nas concentrações de 45, 24 e 26 mg/mL, respectivamente, porque nessas concentrações os extratos solubilizaram no meio de cultura TSB. O EEB-1 teve atividade em 26 mg/mL. Os demais extratos não tiveram atividade contra *S. aureus*.

**Figura 9.** Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/*E. coli*



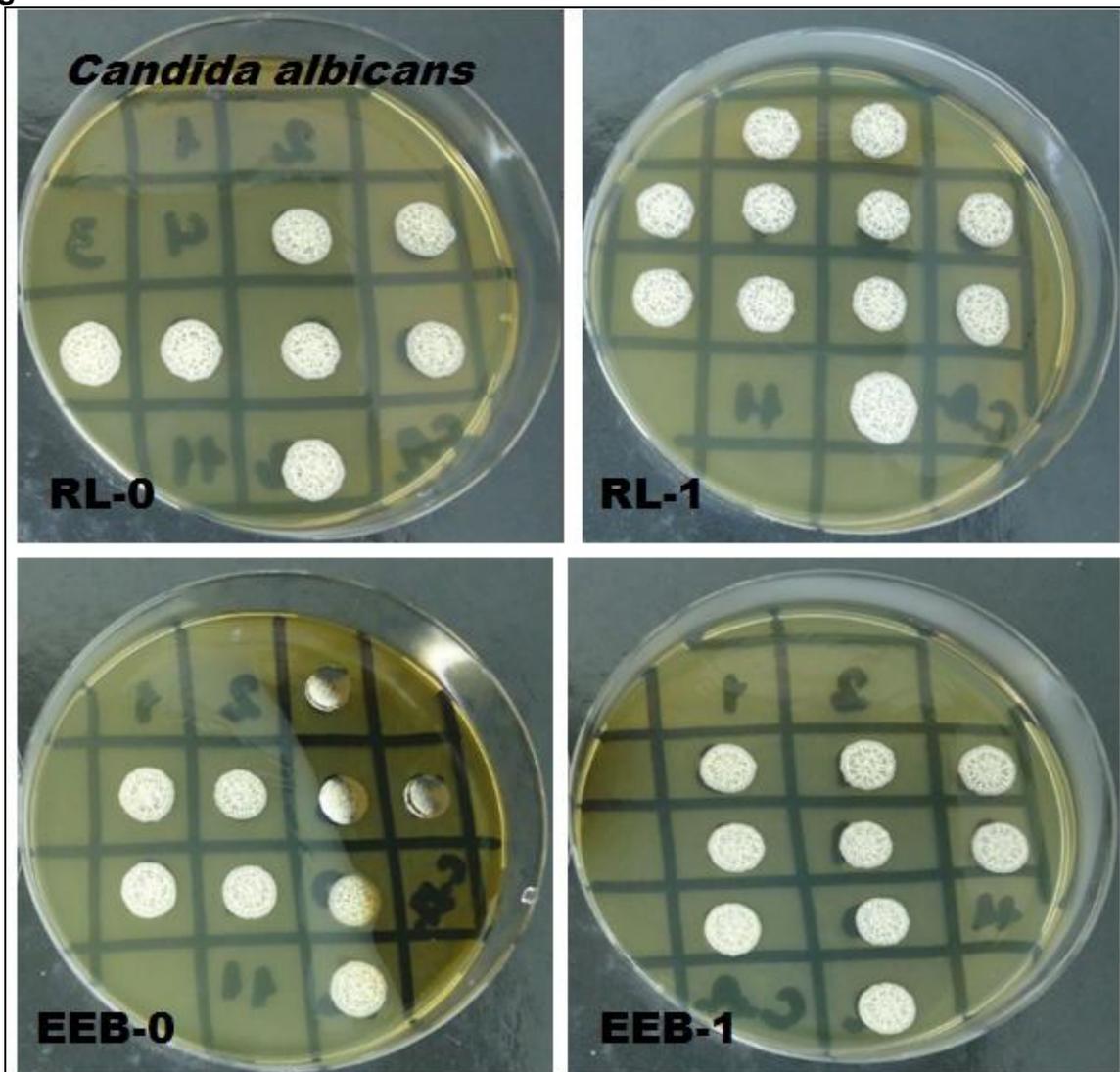
RL-0 apresentou atividade no poço 3. RL-1, EEB-0 e EEB-1 foram usados nas concentrações de 49, 22 e 18 mg/mL, respectivamente, porque nessas concentrações os extratos solubilizaram no meio de cultura LB. Apenas RL-0 apresentou atividade.

**Figura 10.** Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/ *P. aeruginosa*



RL-1 apresentou atividade no poço 2. RL-1, EEB-0 e EEB-1 foram usados nas concentrações de 45, 24 e 26 mg/mL, respectivamente, porque nessas concentrações os extratos solubilizaram no meio de cultura TSB. Apenas RL-0 apresentou atividade.

**Figura 11.** Atividade antimicrobiana de RL-0 e RL-1/*C. albicans*



RL-1 apresentou atividade no poço 4. RL-1, EEB-0 e EEB-1 foram usados na concentração de 2 mg/mL. Só EEB-0 e EEB-1 apresentaram atividade, a CIM foi de 1 mg/mL para ambos.

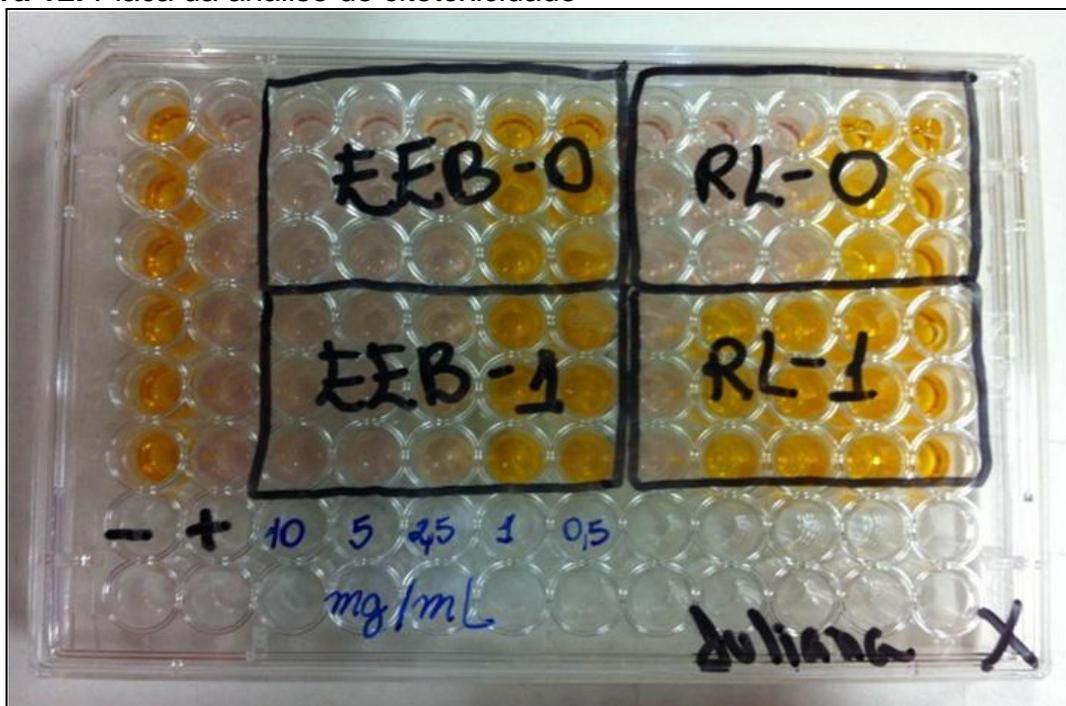
Santos et al.(2009) verificou que o extrato etanólico de *Agave sisalana* não apresentou atividade contra as mesmas bactérias do presente estudo. Em 2013, Ahumada-santos et al, investigou a atividade antibacteriana de 5 espécies do gênero *Agave* (*Agave ornithobroma*, *Agave rzedowskiana*, *Agave schidigera*, *Agave angustifolia*, *Agave tequilana*). Só *Agave schidigera* e *Agave tequilana* apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, as outras espécies não tiveram atividade contra nenhum microrganismo testado.

Os extratos RL-1, EEB-0 e EEB-1 apresentaram atividade contra *Candida albicans* nas concentrações de 25 mg/mL, 1 mg/mL e 1 mg/mL respectivamente. Santos et al (2009), verificou a atividade contra *Candida albicans* na concentração de 0,39 mg/mL.

### 5.2.2 Citotoxicidade

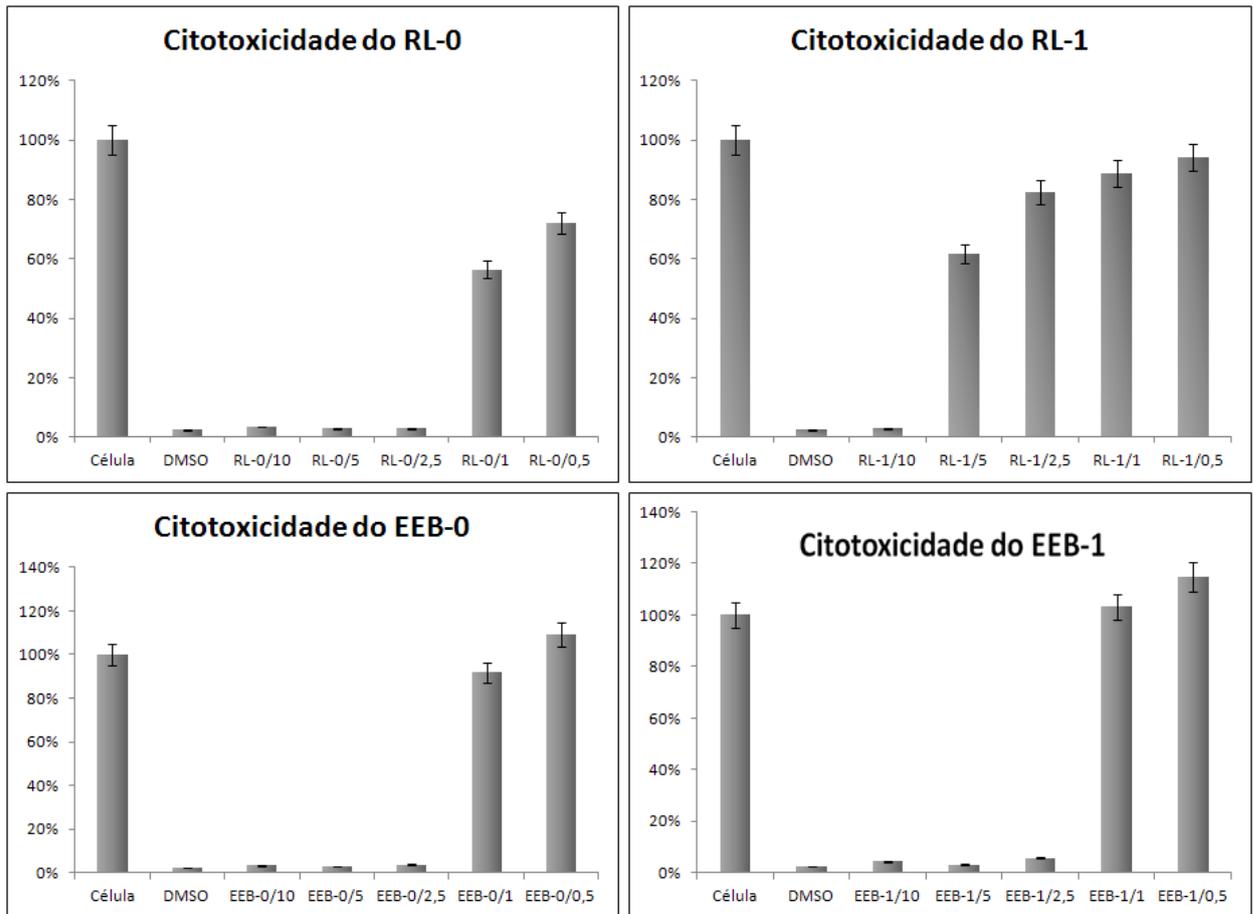
A citotoxicidade dos extratos apresentou um padrão dose-dependente que pode ser visto na Figura 12.

**Figura 12.** Placa da análise de citotoxicidade



Os poços claros representam a existência de dano celular, os extratos, nas concentrações usadas, causaram toxicidade às células HeLa. Nos poços de coloração amarela as células estão viáveis (o corante formazan foi produzido). A figura 13 mostra os valores de viabilidade das células tumorais.

**Figura 13.** Citotoxicidade dos extratos de *Agave sisalana*.



Em relação ao RL-0, a viabilidade celular foi bastante reduzida tanto no extrato puro quanto nas diluições que tinham 50 e 25% de extrato em água. Provavelmente, esse fato está relacionado com questões do armazenamento, pois o mesmo não apresentava, no momento das análises, a mesma coloração e cheiro característicos do suco do sisal logo após ser coletado. Isso pode ser evidenciado, também, pelo fato do RL-1 só apresentar viabilidade celular reduzida (2,81%) na concentração de 10 mg/mL, nas concentrações de 5, 2,5, 1 e 0,5 mg/mL a viabilidade foi de 61,70%, 82,60%, 88,77%, 94,22% respectivamente. O EEB-1 apresentou menor citotoxicidade do que EEB-0. Isso pode ser atribuído à presença de álcool na amostra de EEB-0, esse solvente foi retirado quando a amostra foi seca no spray drying, tornando-se o EEB-1. Não foi encontrado na literatura estudos que comparassem a citotoxicidade de extratos vegetais antes e depois de serem submetidos a um processo de secagem.

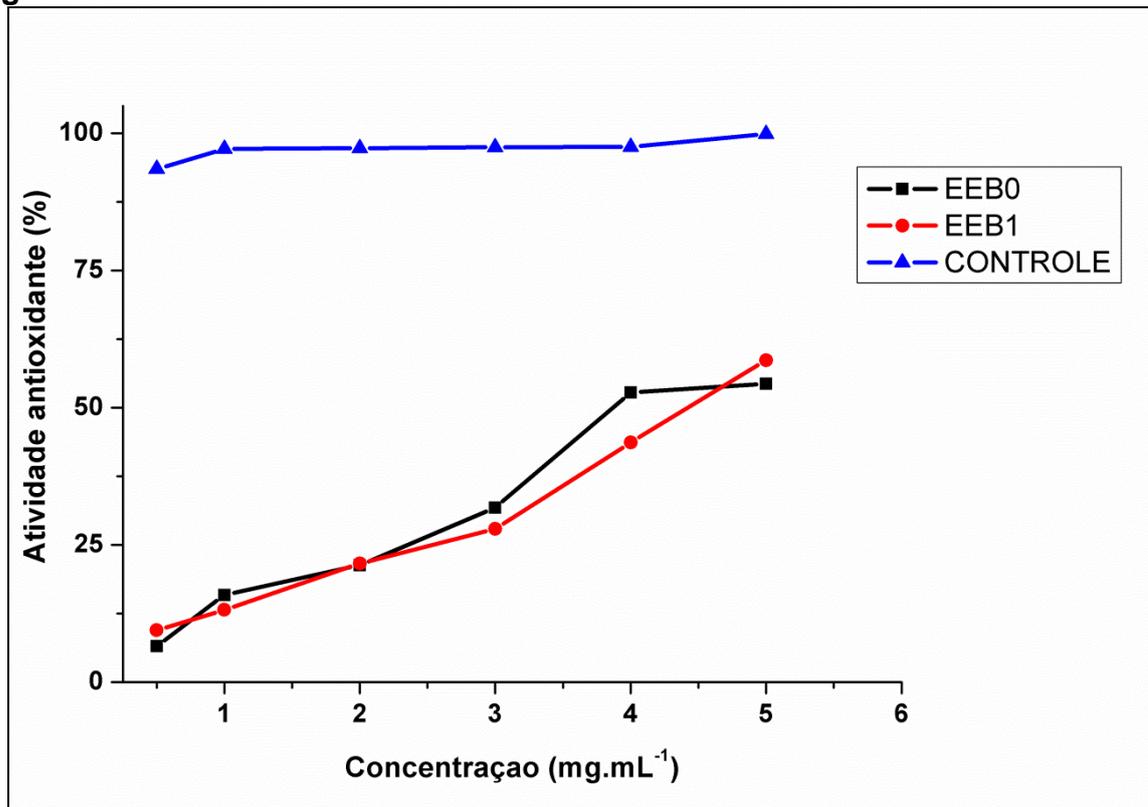
Essas diferenças de toxicidade entre os extratos antes e depois de serem submetidos à secagem por spray drying têm significância estatística avaliada pela análise de variância (ANOVA) fator duplo com  $p < 0,05$ .

Giocondo (2007) realizou uma análise com extratos de *Cryptocarya mandioccana* e verificou que a citotoxicidade, em células HeLa, aumentou conforme o aumento da concentração dos extratos. Em 2013, Souza verificou que o aumento da concentração dos extratos de *Bertholletia excelsa* também ocasionava o aumento da citotoxicidade em macrófagos de camundongos. Os estudos de citotoxicidade *in vitro* têm a vantagem de evitar o uso de animais e de serem ensaios relativamente simples. Além disso, eles possibilitam prever que se um material apresenta toxicidade em células, é muito provável que quando aplicado em tecido vivo ocorra toxicidade (CHRISTINA et al., 2009).

### 5.2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante natural está associada a presença de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, carboidratos e taninos. O método do DPPH tem sido bastante utilizado para extratos de plantas. A partir dos dados do gráfico (Figura 14), verifica-se que o aumento da concentração do extrato é proporcional ao aumento da atividade antioxidante. O controle utilizado foi o ácido ascórbico nas mesmas concentrações usadas para os extratos. O RL-0 e o RL-1 não solubilizaram no etanol e, portanto, não foi possível realizar o ensaio com essas amostras. O resultado pode ser visto da figura 14.

**Figura 14.** Atividade antioxidante dos extratos etanólicos da *A. sisalana*



Ribeiro et al.(2013), relata que *Agave sisalana* apresenta uma reduzida atividade antioxidante, pois requer uma grande quantidade de extrato para eliminar os radicais livres, essa atividade mesmo que reduzida, é atribuída a presença de saponinas. Hua et al.(2014) descreve um estudo no qual um polissacarídeo (GP70-2) extraído de *Psidium guajava* Linn apresentam atividade antioxidante. Silaghi-Dumitrescu e Sârbu (2011) verificaram a presença desse efeito em extratos de própolis e atribuíram a presença de polifenóis. Luo et al.(2014) atribuíram a atividade antioxidante encontrada em *Eleocharis tuberosa* aos flavonoides presentes nesse vegetal. Zhang, Liu e Lin(2014) constataram, pela mesma técnica do DPPH, a atividade antioxidante de polissacarídeos extraídos da *Agave sisalana*.

## **Conclusão**

---

## 6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que *Agave sisalana* representa uma alternativa para a busca de novos agentes terapêuticos. A concentração antifúngica encontrada está dentro do que recomenda a literatura para plantas medicinais. A atividade antioxidante, mesmo que modesta, representa um ganho na busca de novos agentes contra o estresse oxidativo, já que trata-se de resíduos..

Dentre os produtos estudados, os extratos etanólicos poderão embasar estudos para o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica antifúngica. Vale salientar que estudos de isolamento de compostos devem ser realizados com o intuito de se encontrar qual ou quais as substâncias estão relacionadas com os efeitos biológicos.

## Referências

---

## 7. REFERÊNCIAS

- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 196, p. 67–76, nov. 2012.
- AHUMADA-SANTOS, Y. P. et al. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 143–149, ago. 2013.
- ALLSOPP, P. et al. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and the associated anticancer activity. **Anaerobe**, v. 22, p. 38–44, ago. 2013.
- ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G. Tecnologia e Relações Sociais de Produção no Setor Sisaleiro Nordestino: **Revista Econômica do Nordeste**, v. 37, n. 3, p. 368–381, 2006.
- AMARAL, L. F. B. et al. Caryocar brasiliense supercritical CO<sub>2</sub> extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 73, jan. 2014.
- AMORIM, C. R.; QUEIROZ, A.; AFONSO, E. Caracterização dos taninos da Aroeira-preta. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485–492, 2002.
- ARRIZON, J. et al. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 123–130, set. 2010.
- BENAVIDEZ ROZO, M. E. et al. Determination of the profiles of secondary metabolites characteristic of Alternaria strains isolated from tomato. **Revista iberoamericana de micología**, v. 31, n. 2, p. 119–24, 2014.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918–30, dez. 2002.
- BITENCOURT, R. G. et al. Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 272–281, ago. 2014.
- BOTURA, M. B. et al. In vitro ovidical and larvicidal activity of Agave sisalana Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 211–7, 18 fev. 2013.
- BOTURA, M. B. et al. In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (Agave sisalana Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 104–10, 19 abr. 2011.

BRACKENBURY, T. D.; APPLETON, C. C. A comprehensive evaluation of *Agave attenuata*, a candidate plant molluscicide in South Africa. **Acta tropica**, v. 68, n. 2, p. 201–13, nov. 1997.

BRANCO, A. et al. d-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 507–510, nov. 2010.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420–428, dez. 2005.

CHANG, F.-M. et al. Short-term exposure to fluconazole induces chromosome loss in *Candida albicans*: An approach to produce haploid cells. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 70C, p. 68–76, 17 jul. 2014.

CHEN, P. Y. et al. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 5, p. 1789–95, jan. 2009.

CHRISTINA, V. et al. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **Conscientiae saude**, v. 8, n. 1, p. 99–104, 2009.

CIMA, L. et al. Methods of drying leaf samples of barbados cherry sugar cane and citrus for determination of dry matter and macronutrients contents Abstract. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 3, p. 177–180, 2011.

CORNARA, L. et al. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 16–30, 17 ago. 2009.

CORRÊA; R. M. et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia - UFLA**, v. 28, n. 2, p. 339–344, 1999.

DA SILVA, B. P. et al. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 57, n. 5-6, p. 423–8, 2002.

DARROW, K.; DEANE BOWERS, M. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 1, p. 1–11, jan. 1997.

DEBNATH, M. et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. **journal of medicinal plants research**, v. 4, n. 3, p. 177–187, 2010.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, GILVAN. CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre

método colorimétrico e titulométrico. **Revista Ciências exatas e da terra, Ciências agrárias e Engenharias UFG**.v. 8, n. 1, p. 65–78, 2002.

DUNCAN, A C.; JÄGER, A K.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. **Journal of ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 63–70, 15 dez. 1999.

FAVARO, M. T. P. et al. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. **Journal of biotechnology**, v. 173, p. 10–8, 10 mar. 2014.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of Psidium guajava L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, set. 2014.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **The British journal of nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, dez. 2002.

FU, R. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of Sapium sebiferum (L.) Roxb. leaves. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 98–104, jul. 2014.

GARCÍA, M. D. et al. Anti-inflammatory activity of Agave intermixta Trel. and Cissus sicyoides L., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 395–400, ago. 2000.

GEORGOPOULOS, S. T. et al. Thermoplastic polymers reinforced with fibrous agricultural residues. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 2, p. 303–312, nov. 2005.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, nov. 2007.

GIOCONDO, M. P. **Avaliação da atividade apoptótica de substância pura isolada de *Cryptocarya mandioccana* em células de carcinoma cervical imortalizadas pelo papilomavírus humano (HPV)**.70f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas. Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 2007.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. A new technique for spray drying orange juice concentrate. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 342–351, abr. 2010.

GUERRA, J. O. et al. Saponinas esteroidales de la planta Agave brittoniana (Agavaceae) con actividad contra el parásito Trichomona vaginalis. **Revista Biología Tropical**, v. 56, p. 1645–1652, 2008.

GURIB-FAKIM, A. et al. Biological activity from indigenous medicinal plants of Mauritius. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 41–51, 1 jan. 2005.

- HAMMUEL, C. et al. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of agave sisalana. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, n. 4, p. 535–539, 2011.
- HE, X. et al. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological research**, v. 169, n. 9-10, p. 759–67, 2014.
- HUA, D. et al. Structural characterization and DPPH· radical scavenging activity of a polysaccharide from Guara fruits. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 143–7, 15 mar. 2014.
- JIMÉNEZ, Y. C. et al. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, v. 165, p. 198–204, maio 2014.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium ' s health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703–725, 2001.
- KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 385–392, jun. 2010.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, jul. 2011.
- LEGUA, P. et al. Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 60–64, jul. 2014.
- LI, Y.; MAI, Y.; YE, L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. **Composites Science and Technology**, v. 60, n. 2000, 2006.
- LIMA, N. B. C. et al. P.2.d.013 Evaluation of the action mechanism of hecogenin's antidepressant effect from *Agave sisalana* Perrine in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. Supplement 2, p. S275, out. 2012.
- LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 6, p. 681–686, nov. 1987.
- LIU, C.-L. et al. The impact of mgrA on progression of *Staphylococcus aureus* sepsis. **Microbial pathogenesis**, v. 71-72, p. 56–61, 2014.
- LIU, M. et al. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica*. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 73, p. 161–7, dez. 2013.

LOPES, I.; CUNHA, D. A.; MARTINS, F. M. ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Agave sisalana* PERRINE ex EN- GELM ( AGAVACEAE ) . **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 72–78, 2012.

LUO, Y. et al. Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels. **Food chemistry**, v. 164, p. 30–5, 1 dez. 2014.

MARTIN, A. R.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. **Polimeros**, v. 19, n. 1, p. 40–46, 2009.

MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: a macroscale investigation based on available literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–46, 25 nov. 2013.

MELO, E. de C.; RADUNZ, LL.; MELO, R. C. de A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – revisão. **Engenharia na Agricultura**, v. 12, n. 4, p. 307–315, 2004.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas na gravidez.pdf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 21–35, 2001.

MORENO-VILET, L. et al. In vitro assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. **International journal of biological macromolecules**, v. 63, p. 181–7, fev. 2014.

MOTȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 516–522, jun. 2011.

NEVES, P. R. E. M. M. C. E. L. N. L. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.

NGAMWONGSATIT, P. et al. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. **Journal of microbiological methods**, v. 73, n. 3, p. 211–5, jun. 2008.

ORDONEZ, A et al. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 452–458, ago. 2006.

PÉREZ, A. J. et al. Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. **Phytochemistry**, v. 95, p. 298–307, nov. 2013.

PRAZNIK, W. et al. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. **Carbohydrate research**, v. 381, p. 64–73, 15 nov. 2013.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. . C. S. Clonal growth of mammalian cells in vitro. **The journal of experimental medicine**, v. 103, n. 4, 1955.

REBELLO, R. C. D. L.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the total environment**, v. 490, p. 19–27, 15 ago. 2014.

RIBEIRO, B. D. et al. Functional properties of saponins from sisal (Agave sisalana) and juá (Ziziphus joazeiro): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 736–743, set. 2013.

RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. Extraction of saponins from sisal (Agave sisalana) and juá (Ziziphus joazeiro) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 6, p. 965–975, 4 ago. 2013.

SÁNCHEZ, E.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Inhibition of growth and mycotoxin production of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus by extracts of Agave species. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 3, p. 271–9, 15 fev. 2005.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of Agave sisalana. **African journal of biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6181–6184, 2009.

SAPUAN, S M. LEENIE, A. HARIMI, M. BENG, Y. K. Mechanical properties of woven banana fibre reinforced epoxy composites. **Materials and Design**, v. 27, p. 689–693, 2006.

SÁYAGO-AYERDI, S. G. et al. Effects of consuming diets containing Agave tequilana dietary fibre and jamaica calyces on body weight gain and redox status in hypercholesterolemic rats. **Food chemistry**, v. 148, p. 54–9, 1 abr. 2014.

SCOPEL, F.; ANGELO, J.; GREGOLIN, R. Tendências Tecnológicas do Uso do Sisal em Compósitos a Partir da Prospecção em Documentos de Patentes Technological Trends in the Use of Sisal in Composites Through Patent Mining. **Polimeros**, v. 23, n. 4, p. 514–520, 2013.

SEMENYA, S. et al. Medicinal utilization of exotic plants by Bapedi traditional healers to treat human ailments in Limpopo province, South Africa. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 646–55, 18 dez. 2012.

SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, set. 2013.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II . Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587–597, 2010.

SOUZA, C. I. C. C. **Avaliação da atividade antimalárica de bioprodutos da *Bertholletia excelsa* H.B.K.** Dissertação. 88f. Programa de pós-graduação em desenvolvimento regional e meio ambiente. Fundação Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, 2013.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–64, 31 ago. 2000.

TABARAKI, R.; NATEGHI, A.; AHMADY-ASBCHIN, S. In vitro assessment of antioxidant and antibacterial activities of six edible plants from Iran. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 3, p. 159–62, jun. 2013.

TAN, A S.; BERRIDGE, M. V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. **Journal of immunological methods**, v. 238, n. 1-2, p. 59–68, 21 abr. 2000.

VALENZUELA-SÁNCHEZ, K. K. et al. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 4, p. 336–340, jul. 2006.

VERÁSTEGUI, Á. et al. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1249–1252, 21 set. 2008.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51–64, 2010.

WHITTAKER, A. et al. Evaluation of direct and indirect effects of flavonoids, mineral elements and dry weight on antiradical scavenging activity in leaf material of field-grown *Trifolium pratense* cultivars using Path Analysis. **Field Crops Research**, v. 113, n. 1, p. 1–11, jul. 2009.

YOUNG, I. S. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 3, p. 176–186, 1 mar. 2001.

ZAMORA-GASGA, V. M. et al. Granola bars prepared with *Agave tequilana* ingredients: Chemical composition and in vitro starch hydrolysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 309–314, maio 2014.

ZHANG, X.; LIU, L.; LIN, C. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from *Sisal* waste. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 10–18, ago. 2014.

ZHOU, N. et al. Antioxidative effects of *Panax notoginseng* saponins in brain cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 10, p. 1189–95, 15 set. 2014.