



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



JENER DAVID GONÇALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE SAPONINAS OBTIDAS DO
RESÍDUO DE *Agave sisalana* Perrine (SISAL)**

FEIRA DE SANTANA - BA
2009

JENER DAVID GONÇALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
SAPONINAS OBTIDAS DO RESÍDUO DE *Agave sisalana*
Perrine (SISAL)**

FEIRA DE SANTANA - BAHIA
2009

JENER DAVID GONÇALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
SAPONINAS OBTIDAS DO RESÍDUO DE *Agave sisalana*
Perrine (SISAL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Alexandro Branco

FEIRA DE SANTANA - BAHIA
2009

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S235a Santos, Jener David Gonçalves dos
Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e caracterização parcial de saponinas obtidas do resíduo de *Agave sisalana* Perrine (Sisal) / Jener David Gonçalves dos Santos. – Feira de Santana – BA, 2009.

113 f. : il.

Orientador: Alexsandro Branco

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

1. Sisal – Resíduo. 2. *Agave sisalana*. 3. Saponina. 4. Atividade biológica. I. Branco, Alexsandro. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Departamento de Ciências Biológicas. IV. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. V. Título.

CDU: 582.572.43

BANCA EXAMINADORA

Tania Maria Sarmiento da Silva

Prof^a. Dr^a. Tania Maria Sarmiento da Silva
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Sandra Regina de O. D. Queiroz

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina de Oliveira Domingos Queiroz
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Alexsandro Branco

Prof. Dr. Alexsandro Branco
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA - BAHIA
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram para o êxito deste trabalho, especialmente:

A Deus, por ter me iluminado para finalizá-lo.

Aos meus pais, Elza e Jeneci (*in memoriam*), pelo apoio moral e financeiro dedicados ao curso de mestrado, obrigado por terem apostado em mim.

A Rita e meu irmão Douglas pelo apoio durante o mestrado.

A Tia Socorro e aos primos Ramona e Tiago pelo apoio constante durante todo o mestrado, em Feira de Santana.

A CAPES - PROCAD UFF-UFV-UEFS (199/2007) entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos, na cooperação com a UFF e pela concessão da bolsa de mestrado, através do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

A Universidade Estadual de Feira de Santana, pela criação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

A atenção e confiança do meu orientador, Prof. Dr. Alexsandro Branco, que muito me ajudou na realização deste trabalho, principalmente, nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Alex Taranto (UEFS) pelo apoio nas análises espectroscópicas na UFF.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Bagueira (UFF) pela dedicação e apoio nas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Angelo C. Pinto (UFRJ), pelo solvente deuterado.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz, por auxiliar, na identificação espectral da saponina.

Ao Prof. Dr. Jorge M. David (UFBA), pelas análises de RMN.

A Profa. Dra. Angélica Luchesse (UEFS) pelas análises de CG-EM.

À Prof. Dra Ana Paula Trovatti Uetanabaro, por aceitar-me no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) e auxiliar nos experimentos de atividade biológica.

Aos professores do Horto Florestal: Dra. Sandra Regina de O. D. Queiroz e Dr. Juan Tomás Ayala Osuna, pela oportunidade e inserção no grupo de pesquisa sobre o aproveitamento dos resíduos do sisal, na graduação. Muito Obrigado!

Aos amigos e pesquisadores Tonny Cley e Amanda Sena, no apoio, nas conversas e principalmente, intermediando os contatos com outros laboratórios de pesquisa.

A todos os colegas do laboratório de Fitoquímica em especial a Jósquia e Sarah.

Aos colegas e biólogos Fernando e Marcela, pela ajuda na coleta do resíduo do sisal.

A todos os colegas do LAPEM, principalmente as biólogas Alice e Carla.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e aos secretários Alberto e Janilza.

“Todas as coisas cooperam para
o bem daqueles que amam à Deus”
Romanos 8:28

RESUMO

A planta *Agave sisalana*, comumente conhecida como sisal, apresenta grande importância econômica para a região nordeste do Brasil como fornecedora de fibras duras. Neste processo o aproveitamento da planta é de aproximadamente 5%, sendo o restante, descartado na forma de resíduo. Entre os estados, a Bahia se destaca pela expressiva produção (95 %), correspondendo 234.000 toneladas de fibras, em 2008. O presente trabalho descreve: 1) a atividade antimicrobiana comparativa entre os extratos obtidos da folha e do resíduo descartado; 2) a obtenção, análise química e atividade anti-*Candida albicans* de diferentes extratos obtidos a partir do resíduo e; 3) a caracterização parcial de uma mistura de saponinas espirostanas do resíduo. Inicialmente foi realizado um levantamento sobre as saponinas espirostanas do gênero *Agave* e suas atividades biológicas. Em seguida, procedeu-se a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos foliares e do resíduo de *Agave sisalana* frente a dez microorganismos o que revelou significativa inibição dos extratos contra *Candida albicans* e fraca inibição para os demais. Após esta constatação foi realizada a obtenção de extratos a partir do resíduo de sisal contendo saponinas. Os espectros de RMN de ^1H apresentaram sinais característicos para saponinas esteroidais para todos os extratos. O extrato acetato de etila foi fracionado utilizando coluna aberta recheada com sílica-gel e eluída com solventes na ordem crescente de polaridade produzindo 28 frações. As frações 7-9 foram reunidas e purificadas por sephadex LH-20 resultando na obtenção de um mistura de saponinas espirostanas. Esta mistura de saponinas foi analisada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , incluído técnicas bidimensionais. A partir destes resultados os extratos obtidos do resíduo foram submetidos à avaliação contra *C. albicans* para obter a concentração inibitória mínima. O extrato butanólico apresentou maior inibição (0,19 mg/mL) quando comparado com os demais extratos.

Palavras-chaves: *Agave sisalana*; Resíduo do sisal; Saponina esteroidal; Atividade biológica.

ABSTRACT

(Antimicrobial activity of extracts and partial characterization of saponins obtained the waste *Agave sisalana* Perrine (sisal)).

The plant *Agave sisalana*, commonly known as sisal, has great economic importance for the northeast region of Brazil, as a provider of hard fibers. In this case, the use of the plant is approximately 5%, the remains being discarded as waste. Among the states, Bahia is highlighted by significant production (95%), corresponding to 234,000 tons of fiber, in 2008. This paper describes: 1) the antimicrobial activity comparison between the extracts of the leaf and the residue discarded, 2) the obtain, the chemical analysis and anti-*Candida* activity of different extracts from the residue, and 3) the partial characterization of a mixture of spirostan saponins residue. Initially a survey was conducted spirostan saponins in the genus *Agave* and their biological activities. Then, the evaluation of the antimicrobial activity of plant extracts and the residue of *Agave sisalana* against five Gram-positive bacteria, four Gram-negative bacteria and yeast revealed a significant inhibition of the extracts against *Candida albicans* and weak inhibition for the other microorganisms. After this finding, it was performed the obtaining of extracts containing saponins. The dried crude extract obtained from the residue was partitioned using ethyl acetate and isobutanol to provide the substrates ethyl acetate, butanol and aqueous. The analysis of NMR spectra of ^1H demonstrated characteristic signs for steroidal saponins for all extracts. The ethyl acetate extract was fractionated using open column with silica gel and eluted with this solvent in order to increase the polarity yielding 28 fractions. Fractions 7-9 were combined and purified by Sephadex LH-20 resulted in obtaining a mixture of saponins spirostan. This mixture of saponins was analyzed by nuclear magnetic resonance of ^1H and ^{13}C , including 2D NMR techniques. From these results, the extracts of the residue were evaluated against *Candida albicans* for the minimum inhibitory concentration. The butanol extract demonstrated higher inhibition (0.19 mg / mL) compared with the ethyl acetate extract and aqueous tested.

Keywords: *Agave sisalana*, Waste sisal, Steroidal saponins; Biological activity;

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

1	SAPONINAS	01
1.1	Saponinas Espirostanas	03
1.2	Atividades biológicas de saponinas espirostanas	11
1.3	As saponinas espirostanas em <i>Agave</i>	20
	Referências	27
CAPÍTULO 1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Agave sisalana</i>	44
	Resumo	45
	Abstract	46
1	Introdução	47
2	Material e métodos	48
3	Resultados e discussão	50
	Referências	54
CAPÍTULO 2	OBTENÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO RESÍDUO DE <i>Agave sisalana</i> E ATIVIDADE BIOLÓGICA	60
	Resumo	61
	Abstract	62
1	Introdução	63
2	Material e métodos	65
3	Resultados e discussão	68
4	Considerações Finais	73
	Referências	75
CAPÍTULO 3	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE SAPONINAS DO RESÍDUO de <i>Agave sisalana</i>	89
1	Introdução	90
2	Material e métodos	91
3	Resultados e discussão	92
	Referências	95
	Dados espectrais da mistura de saponinas	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS		111

INTRODUÇÃO GERAL

1 SAPONINAS

As saponinas são metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas superiores e em alguns organismos marinhos. São conhecidas por serem compostos surfactantes, não voláteis e por apresentar gosto amargo e acre. O nome saponina deriva da palavra, em latim, *sapone* que significa sabão. Esta denominação é atribuída às moléculas de saponina, pois formam espuma persistente quando agitadas em solução aquosa. Instintivamente, as saponinas são usadas como detergentes, agentes espumantes e emulsificantes (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

As saponinas são constituídas por uma porção lipofílica e a outra porção hidrofílica composta por unidades glicosídicas. Os principais açúcares encontrados em saponinas são as pentoses, as hexoses (arabinose, glicose, galactose, frutose, xilose, ramnose) e alguns derivados de ácidos urônicos (glicurônicos e galacturônico). A combinação dos grupamentos polares aos elementos estruturais não-polares das saponinas pode explicar as propriedades de redução da tensão superficial da água, apresentando assim, as ações detergentes e emulsificante, como pode ser observado para o uso do sabão em soluções aquosas (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2002; COSTA, 2001).

As cadeias de açúcares encontradas nas saponinas podem estar ligadas à aglicona em um ou dois sítios de glicosilação, através de uma ligação osídica (função orgânica éter) que se dá predominantemente no carbono C-3 da aglicona. Em relação às cadeias de açúcares, as saponinas podem ser classificadas como monodesmosídica (possui apenas uma cadeia de açúcar), bidesmosídica (duas cadeias) e tridesmosídica (três cadeias) (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Os efeitos medicinais das plantas podem ser atribuídos a apenas uma substância e/ou na combinação de compostos orgânicos originados do metabolismo secundários do vegetal. Esses compostos possuem funções importantes na ecofisiologia da planta, resultando no sucesso de sobrevivência da espécie em seu habitat natural (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2002).

As saponinas estão presentes em muitas espécies vegetais e são consideradas como parte do seu sistema de defesa. Estudos anteriores mostram que diversas saponinas apresentam ação antimicrobiana, antifúngica e ação

protetora contra ataques de insetos. A grande complexidade da estrutura química das saponinas consiste na variabilidade das estruturas das agliconas, na natureza da(s) cadeia(s) glicosídica(s) laterais e na posição em que elas estão ligadas a estrutura da aglicona (FRANCIS et al, 2002).

As saponinas estão presentes em diversas plantas utilizadas na medicina popular. Estes compostos são responsáveis por propriedades farmacológicas, consideradas, como ingredientes chaves na Medicina Tradicional Chinesa (SPARG; LIGHT; STADEN, 2004). A espécie *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae), popularmente conhecida como ginseng, é uma das plantas mais utilizadas na medicina oriental. As saponinas presentes nas raízes do ginseng apresentam atividades biológicas comprovadas cientificamente. Recentemente, as propriedades afrodisíacas e adaptógenas das saponinas do ginseng foram revisadas. Estes estudos certificaram que o ginseng quando usado apropriadamente não apresenta toxicidade, sendo assim o seu uso seguro para o paciente (ATTELE et al, 1999). Em outro estudo, as saponinas do ginseng mostraram atividade cicatrizante. A comprovação desta ação envolveu a avaliação dessas saponinas no metabolismo, na ativação e síntese do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). A modificação na expressão dos receptores TGF- β em fibroblastos teve com objetivo de elucidar a contribuição do TGF- β no mecanismo de cicatrização. Resumidamente, as saponinas do ginseng estimulam o processo de cicatrização através de alterações da matriz extracelular, acompanhada da modificação da expressão dos receptores TGF- β (KANZAKI et al, 1998).

As saponinas isoladas de *Panax vietnamiensis* Ha Grush apresentaram ação hepatoprotetora. Esta atividade foi comprovada usando células hepáticas de ratos induzidas a necrose tumoral por D-galactosamina e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esse estudo conclui que o efeito hepatoprotetor do ginseng vietnamita é devido à estrutura saponínica apresentar uma cadeia lateral com octiol (TRAN et al, 2001).

Em *Polygala senega* L. (Polygalaceae), outra espécie de planta muito utilizada na medicina popular oriental, as saponinas apresentaram grande potencial como adjuvante em vacinas, aumentando a resposta imune em ratos estimulados com ovalbumina e imunizados com rotavírus (ESTRADA et al, 2000).

De um modo geral, as saponinas apresentam propriedades hemolíticas e toxicidade para animais de sangue frio (pecilotérmicos). A planta *Barringtonia asiatica* Kurz (Lecythidaceae) tem sido utilizada, tradicionalmente, por pescadores nativos asiáticos e do oceano pacífico como anti-séptico (HERLT et al, 2002).

As saponinas triterpênicas, mais comumente encontradas na natureza e geralmente com 30 átomos de carbono, no processo de ciclização do óxido de esqualeno, adquirem uma conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco e, conforme o arranjo vai dar origem aos triterpenos tetracíclicos ou pentacíclicos. As agliconas mais comumente encontradas para as saponinas triterpênicas pentacíclicas classificam-se conforme o esqueleto em: β -amirina (oleanano), α -amirina (ursano) ou lupeol. O esqueleto do tipo β -amirina apresenta duas metilas no C-20, enquanto o esqueleto do tipo α -amirina apresenta uma metila em C-20 e outra em C-19. A conformação das α - e β -amirina é *trans* para os anéis A/B, B/C e C/D e *cis* para D/E. Por outro lado, as saponinas com o núcleo lupeol (lupano) apresentam a conformação *trans* entre os anéis D/E, e o anel E possui cinco carbonos e não seis como nas amirinas (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2002).

As saponinas do tipo oleanano, derivadas do ácido oleanólico (ácido 3 β -hidróxi-olea-12-en-28-óico), têm como elementos principais: a insaturação no C-12 (13); a funcionalização do grupamento metila nos C-28, C-23 e/ou C-30 e poliidroxilação. As saponinas bidesmosídicas mais comumente encontradas para os derivados do ácido oleanólico são aquelas substituídas nas posições 3 e 28 (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2002).

1.1 Saponinas Espirostanas

As saponinas esteroidais podem ser classificadas como saponina esteroidal propriamente dita, espirostanas e furostana. Todos os compostos destas classes apresentam na aglicona o núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Os glicosídeos furostanos apresentam junto ao núcleo esteroidal um anel furostano e a(s) unidade(s) de açúcar nas posições C-3 e C-26. Por apresentar dois sítios de glicosilação as saponinas furostanas são classificadas como bidesmosídicas (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2002).

As saponinas furostanas são consideradas precursores biossintéticos para a forma espirostanas. Estes compostos podem ser convertidos em saponinas espirostanas através de reação catalisada por enzimas. Este fato ocorre comumente em sementes, raízes ou bulbos de plantas funcionando como agentes de proteção, principalmente na inibição fúngica (YANG et al, 2006; WANG. et al, 2007).

Entre as saponinas esteroidais, as saponinas espirostanas constituem o maior número. A porção apolar destes metabolitos é caracterizada por um sistema de anéis hexacíclico e a uma cadeia de unidades de monossacarídeos geralmente ligada ao C-3. Este sistema de anéis é formado pelo núcleo esteroidal e um anel bicíclico unido pela função espiro (WANG et al, 2007).

Atualmente, cerca de 100 diferentes saponinas contendo como aglicona o núcleo esteroidal espirostanos, foram isoladas de plantas. Dentre as saponinas espirostanas descritas na literatura pode-se caracterizar 12 tipos diferentes de aglicona. Estas diferenças estão na presença de oxidação, carbonila em C-12 e ligação dupla em C-5 e C-25 e na estereoquímica dos grupamentos químicos. A figura 1 apresenta estes diferentes núcleos espirostanos encontrados em plantas (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

A identificação química das saponinas, de um modo geral, constitui em um árduo trabalho devido ao fato destes compostos, apresentarem alto peso molecular (dentre 200 a 300 daltons). Outro fato complicador é a presença de uma miscelânea de saponinas necessitando a aplicação de técnicas sofisticadas de separação (WANG et al, 2007).

A hidrólise das saponinas é realizada por via química com auxílio de um ácido mineral (catalisador), com finalidade de liberar as agliconas. A extração das agliconas é realizada com solventes de polaridade intermediária como acetato de etila e clorofórmio. Essas etapas são úteis na caracterização parcial na elucidação estrutural das saponinas. Entretanto recentes técnicas de ressonância magnética nuclear (HMBC, HMQC, $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY) têm possibilitado a determinação das estruturas das saponinas sem a necessidade do emprego de técnicas destrutivas (AGRAWAL; PATHAK, 1996).

As técnicas cromatográficas usualmente utilizadas são: cromatografia em camada delgada, coluna cromatográfica aberta, cromatografia “flash”, cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE e Sephadex LH 20 (OLESZEK, BIALY, 2006). Geralmente são empregadas mais de uma no processo de obtenção das saponinas.

Uma outra característica estrutural marcante nas saponinas espirostanas é a presença de vários estereocentros. Aliado a este fato, a presença de isômeros para a aglicona, principalmente nos centros quirais na posição C-20, C-22 e C-25, podem ocorrer em espécies diferentes de plantas. A proporção dos isômeros depende de fatores como a parte morfológica e o estágio de desenvolvimento da planta. A presença de epímeros em mistura também pode ocorrer na planta (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

A configuração no C-17 apresenta-se em posição β . Este fato foi comprovado pela conversão da diosgenina em colesterol, e em relação ao C-20, a esteroquímica encontra-se em posição α nas saponinas naturais (COSTA, 2001). A metila presente no núcleo espirocetal em C-25 possui duas conformações. A conformação axial caracteriza a série *normal 25S* ou neo-sapogeninas (metila na posição β). A metila na conformação equatorial refere-se aos compostos a série *iso 25R* ou iso-sapogeninas (metila na posição α). A conformação equatorial (*25R*) é mais estável que a conformação axial (*25S*) (COSTA, 2001; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

As saponinas de núcleo furostano apresentam cadeia lateral com ligação osídica na hidroxila em C-26. São menos freqüentes e, por hidrólise, transformam-se em estruturas do tipo espirostanas através do fechamento do anel. O isômero axial das sapogeninas (C -26) pode ser convertido para o isômero equatorial. O tratamento com ácido clorídrico em solução metanólica, isomeriza-se, por exemplo, a sarsasapogenina em smilagenina (COSTA, 2001). Os produtos formados quando tratados com ácido mineral (e.g. ácido clorídrico), em solução alcoólica, sob refluxo, possibilita a formação do equilíbrio dos isômeros, ou seja, regeneram as formas *normal* e *iso* (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Em relação à conformação espacial, a fusão dos anéis A e B pode ser *cis* (H-5 em posição β) ou *trans* (H-5 em posição α). Já a fusão dos anéis B/C e C/D apresentam a configuração *trans*, enquanto que os anéis D/E têm junção *cis* (figura 2) (ATHAYDE; GOSMANN; SCHENKEL, 2002).

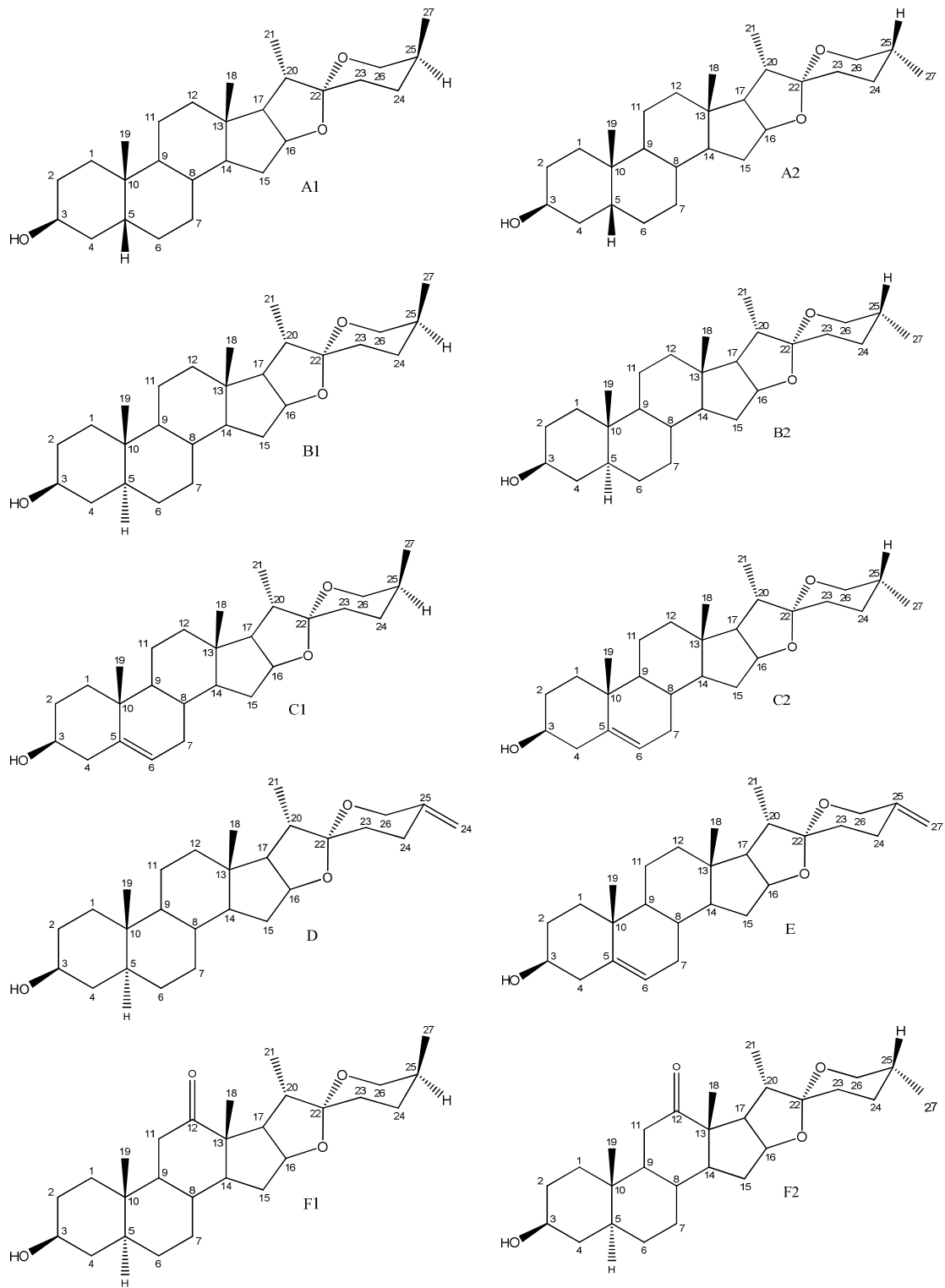


Figura 1. Estruturas das agliconas com o anel espirostanos.
 Fonte: HOSTETTMANN; MARSTON, 1995.

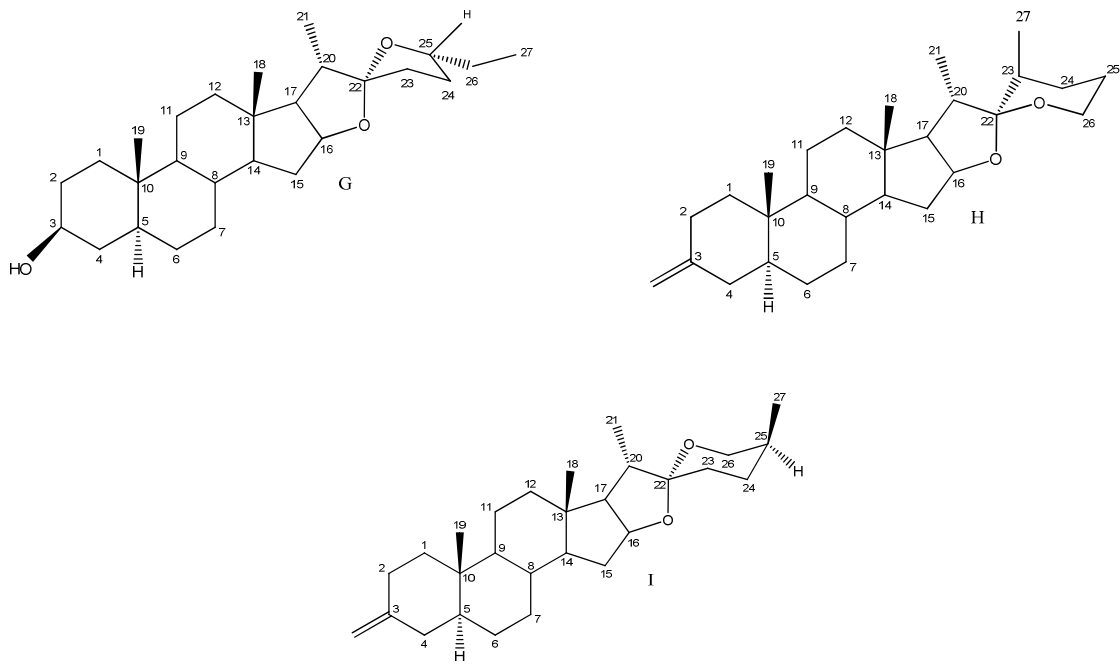


Figura 1: Continuação

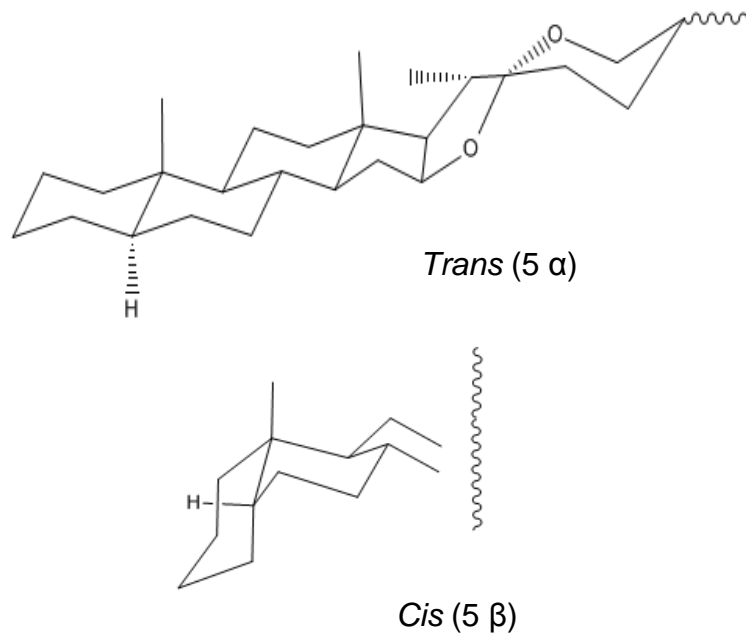
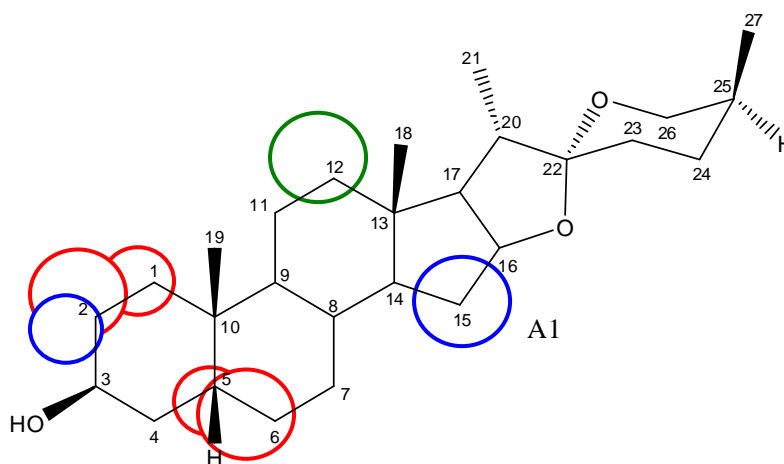


Figura 2: Conformação espacial dos anéis AB em esqueleto básico de saponinas espirostanas.
Fonte: HOSTETTMANN; MARSTON, 1995

A separação cromatográfica das saponinas espirostanas que se diferenciam apenas na posição C-25 na estrutura podem ser extremamente difícil. Por isso, algumas saponinas esteroidais, possuindo diferenças estruturais epiméricas em 25*R* e 25*S*, geralmente são isoladas e identificadas em mistura (MIYAHARA et al, 1983).

A grande parte das saponinas espirostanas isoladas apresentam as cadeias de açúcares ligadas na posição C-3 da aglicona. Entretanto, oxidações podem ocorrer em outros carbonos da aglicona, principalmente nas posições C-1, C-2, C-5, C-6 e C-11. As sapogeninas isoladas de espécies da família *Liliaceae* apresentam geralmente oxidações em C-1, C-2, C-5 e/ou C-6, já na família *Amaryllidaceae* ocorrem em C-12 e na família *Scrophulariaceae* no C-2 e/ou C-15 (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

A Figura 3 mostra as oxidações presentes nas agliconas das saponinas espirostanas em algumas famílias de mono e dicotiledôneas.



Legenda:

- *Liliaceae* (monocotiledôneas)
- *Amaryllidaceae* (monocotiledôneas)
- *Scrophulariaceae* (dicotiledôneas)

Figura 3. Posição das oxidações encontradas na aglicona de saponinas espirostanas em mono e dicotiledôneas.

Fonte: HOSTETTMANN; MARSTON, 1995.

As saponinas espirostanas apresentam características peculiares nas análises espectrais de RMN de hidrogênio (RMN ^1H). Uma delas são os sinais referentes aos grupamentos metilenos fora do plano, correspondentes a C-18, C-19, C-21 e C-27. A presença de substituintes ou instaurações em distintas posições pode alterar o deslocamento químico dessas metilas angulares. As metilas em C-18 e C-19 surgem como simpletos com deslocamento químico entre 0,95 e 1,10 ppm e as metilas C-21 e C-27 surgem como dubletos que acopla com H-20 e o H-25 respectivamente, apresentando deslocamento químico entre 0,78 e 0,80 ppm (DING et al, 1989; DING et al, 1993)

A atribuição dos sinais nos espectros de RMN de hidrogênio é iniciada pelos sinais mais desblindados, pois são facilmente identificáveis. Estes sinais compreendem a hidrogênio ligado a átomos de carbono com hibridização sp^2 ou ligados a um átomo de oxigênio. Os espectros de RMN de carbono (RMN ^{13}C) são muitos úteis na elucidação da estrutura das saponinas espirostanas, devido a sensibilidade dos sinais, o tipo e a esteroquímica dos substituintes. A atribuição dos sinais nos espectros de RMN de carbono é iniciada também pelos mais desblindados, pois são facilmente identificáveis. As saponinas espirostanas têm como característica básica da presença de um carbono quaternário em C-22 (δ_{C} 108,7 – 109,9 ppm). Os Δ^5 espirostanos apresentam sinais $141,2 \pm 0,5$ e $121 \pm 0,4$ ppm atribuídos ao C-5 e C-6, respectivamente (AGRAWAL; PATHAK, 1996; ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999).

A região polar das saponinas espirostanas compreende os monossacarídeos. São caracterizados partir do número de sinais correspondentes aos hidrogênios ligados a carbono anomérico (e.g δ_{H} ; 4,70; 4,90; 5,00 e 5,10) e comparados com espectros de açúcares livres. Uma das informações mais importantes obtidas nesta análise é o modo de ligação entre as unidades de açúcares (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999 DING et al, 1989).

Outras técnicas são utilizadas na elucidação estrutural das saponinas espirostanas. As análises de correlação espectroscópica homonuclear ($^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY) combinada com os espectros de correlação heteronuclear múltiplo quântica (HMQC) permitem correlacionar os sinais dos hidrogênios e carbonos. O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de longa distância com detecção de hidrogênio (HMBC) permite confirmar a correta atribuição dos sinais de carbono e hidrogênio destas saponinas (AGRAWAL; PATHAK, 1996).

As monocotiledôneas são as principais fontes de saponinas esteroidais, como alguns representantes das famílias *Liliaceae*, *Dioscoreaceae* e *Agavaceae*. As saponinas esteroidais podem ser também encontradas nas famílias *Amaryllidaceae*, *Bromeliaceae* e *Palmae*. Estudos recentes identificaram saponinas espirostanas em dicotiledôneas, como nas famílias *Asteraceae* (*Aspilia montevidensis*), *Balanitaceae* (*Balanites aegyptiaca*), *Leguminosae* (*Trigonella foenum-graecum*) e *Zygophyllaceae* (*Tribulus terrestris*). A frequência de saponinas espirostanas em plantas é maior nas famílias de monocotiledôneas. Neste contexto, destacam-se as espécies de *Amaryllidaceae*, no qual se destacam as espécies de *Yucca* e *Agave*. Os gêneros mais importantes como fontes de saponina esteroidais estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Saponinas espirostanas em monocotiledôneas.

Família	Gênero
<i>Liliaceae</i>	<i>Trillium; Chorogalum; Smilax; Nolina, Agapanthus</i>
<i>Agavaceae</i>	<i>Agave; Yucca e Manfreda</i>
<i>Dioscoreaceae</i>	<i>Dioscorea</i>

Fonte: HOSTETTMANN; MARSTON, 1995.

A família *Dioscoreaceae* possui 250 espécies conhecidas, que crescem principalmente no México e na América Central. Suas raízes apresentam bulbos que são excelentes fontes de saponinas esteroidais. Estes tubérculos são usados como alimento (inhame) e inclui as espécies *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. cayennensis*, *D. esculenta* e *D. opposita* (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). Na espécie *Manfreda gigantea* foi relatada a presença de saponinas espirostanas contendo como aglicona a gitonenina (MARKER; LOPEZ, 1947).

As saponinas presentes no gênero *Allium* (*Liliaceae*) têm sido encontradas preferencialmente nas flores e nas sementes; já nas folhas e nos bulbos estes compostos são encontrados na forma de glicosídeos contendo núcleos furostanos e espirostanos. Na espécie *Allium minutiflorum* foram identificados três saponinas denominadas minutosídio A, minutosídio B, minutosídio C, e duas sapogeninas:

alliogenina e neoagigenina (BABA et al, 2000; MATSUURA, 2001; BARILE et al, 2007).

Estudos mais recentes sobre o feno grego possibilitaram a identificação da presença da saponina denominada de SA-III nas sementes. Essa saponina apresenta a aglicona espirostanana yamogenina (SAXENA; SHALEM, 2004).

Outras plantas têm sido investigadas quanto à presença de saponinas principalmente espécies da família *Scrophulariaceae*, *Leguminosae*, *Solanaceae*, *Simaroubaceae*, *Cornaceae*, *Zygophyllaceae*, *Ranunculaceae*, *Asteraceae* e *Cruciferae* (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

O reconhecimento da expansão das aplicações das saponinas e o aumento das evidências de seus benefícios à saúde levaram a investigação de processos na produção de saponinas em uma escala comercial a partir de fontes naturais (BALANDRIN et al, 1996).

As saponinas espirostananas apresentam como uma importante classe de produtos naturais para as indústrias farmacêuticas por ser matéria-prima para a produção de hormônios sexuais (principalmente anticoncepcionais, corticosteróides, diuréticos esteroidais e vitamina D). A principal espécie fornecedora de saponina espirostanana para a indústria é *Dioscorea composita* (Dioscoreaceae) que bioproduz a saponina diosgenina em quantidades relevantes (3,5-5,0 % do peso bruto) (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

1.2 Atividades biológicas de saponinas espirostananas

As saponinas esteroidais são surfactantes naturais presentes em grande parte dos vegetais, inclusive naqueles utilizados na alimentação e como plantas medicinais. Estes glicosídeos apresentam uma imensa diversidade estrutural e um amplo espectro de atividade biológica (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Entre as atividades biológicas, a hemólise é a característica geral compartilhada por muitas saponinas com estruturas diferentes. Esta atividade é atribuída ao fato das saponinas em geral formarem complexos com os esteróides da membrana dos eritrócitos, causando um aumento na permeabilidade e a subsequente perda da hemoglobina (COSTA, 2001; WANG, et al, 2007).

No entanto, as saponinas furostanas bidesmosídicas possuem baixa atividade hemolítica e não apresentam efeitos bacteriostáticos e/ ou fungicidas e não formam complexos com o colesterol. Sua única propriedade típica de saponina é formar espuma quando agitadas em solução aquosa (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Estudos recentes sobre sapogeninas estruturalmente semelhantes indicam alguns aspectos importantes que implicam na atividade biológica, principalmente na atividade antiproliferativa. As principais características são: a conformação espacial do composto e sua atividade redox. Essas características foram investigadas por modelagem molecular (TROUILLAS et al, 2005).

1.2.1 Atividade antimicrobiana

Entre as avaliações de atividade biológica com produtos vegetais, a atividade antimicrobiana é uma das mais utilizadas. As saponinas 5 β -spirostan-3 β -ol isoladas da fração butanólica de *Yucca schidigera* demonstraram atividade antimicrobiana. Estes isolados foram testados contra os organismos *Bacillus pasteurii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados revelaram que as saponinas foram capazes de inibir o crescimento em baixa densidade de células, entretanto não inibiram o crescimento microbiológico de populações densas (KILLEEN et al, 1998).

As saponinas espirostanas isoladas de *Dracaena mannii* (Agavacea), apresentam relevante atividade fungicida, também mostraram ação bactericida. Entretanto foram nativas contra bactérias Gram-negativas e mostrou fraca inibição contra bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (OKUNJI et al, 1990).

As saponinas esteroidais isoladas de algumas plantas monocotiledôneas (*Agave americana*, *Polianthes tuberosa*, *Polygonatum zanlanscianense*, e *Dioscorea parviflora*) foram submetidas à avaliação da atividade antifúngica. Os microorganismos testados foram *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. As agliconas testadas foram: hecogenina, neohecogenina, tigogenina, neotigogenina, chlorogenina e diosgenina (YANG et al, 2006). Os resultados mostraram que a atividade destas saponinas esteroidais está relacionada com suas sapogeninas (aglicona), o número e a estrutura das unidades de monossacarídeo presentes na porção hidrofílica.

Neste estudo foi também analisada a relação entre a atividade antifúngica e citotóxica em células de mamíferos e das saponinas. Os dados revelam que as saponinas isoladas possuem potencial para futuros testes pré-clínicos (YANG et al, 2006).

Sautour e colaboradores (2004) isolaram saponinas espirostanas e furostanas dos rizomas de *Dioscorea cayenensis* Lam.-Holl (Dioscoreaceae) e avaliaram a atividade antifúngica contra as leveduras patogênicas *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. As saponinas espirostanas apresentaram CIM de 12,5; 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente. Porém suas saponinas furostanas correspondentes demonstraram baixas ou nenhuma atividade.

Um estudo similar foi realizado com produtos sintéticos a partir das saponinas dioscina, dioscinina e seus produtos de hidrolises parciais. Foi observado que a atividade antifúngica está relacionada ao número de resíduos de açúcar. As saponinas com cadeias de açúcares ramificadas apresentaram forte atividade quando comparadas com cadeias lineares. A presença da hidroxila no carbono 17 de derivados da dioscina reduz tanto a atividade hemolítica quanto da atividade fungicida (TAKECHI; TANAKA, 1991).

O complexo sisalina, composto por saponinas espirostanas do suco das folhas do sisal apresentou atividade antifúngica em testes contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus*, *C.albicans*; *R. glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae* (UJIKAWA; PURCHIO, 1989).

Os extratos obtidos a partir de rizomas e partes aéreas de *Trillium grandiflorum* Michx (Liliaceae) mostram relevante atividade “*in vitro*” contra *C. albicans*. O fracionamento destes extratos permitiu o isolamento de duas saponinas espirostanas denominadas de TG-I e TG-II. As agliconas identificadas foram a diosgenina e pennogenina, respectivamente. Ambas possuem valores de concentração inibitória mínima (CIM) comparáveis para anfotericina, nos testes de difusão em ágar com *C. albicans*. Elas também exibem algumas atividades contra *Cryptococcus neoformans* e *S. cerevisiae*, contra os fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes* (HUFFOR; LIU; CLARK, 1988).

A saponina espirostanas *spiroconazol* A isolada a partir das espécies *Dracaena mannii* e *D. arborea* (Agavaceae) foi submetida avaliação antimicrobiana contra 17 espécies de fungos e quatro espécies de bactérias. Os resultados revelaram atividade contra todos os fungos testados (OKUNJI et al, 1996). Em

trabalho semelhante Hufford e colaboradores (1988) avaliaram a atividade da sarsapogenina triglicosilada As-1, isolada de *Asparagus officinalis* contra as espécies *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichorophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyto*. Os resultados revelaram CIM no intervalo de 0,5 µg/mL até 8 µg/mL.

1.2.2 Atividade antiparasitária

A planta *Yucca schidigera* contém saponinas que possuem atividade antiparasitária. Em um estudo com doenças parasitárias que ocorrem no trato gastrointestinal, as saponinas foram tão ativas quanto à droga metronidazol, utilizada como referência, que é capaz de matar os trofozoítos da *Giardia lamblia* no intestino, *in vitro*. Essa espécie contém mais de 10 % do seu peso bruto de saponinas esteroidais. As frações hidrolizadas de *Yucca* contém agliconas espirostanas e furostanas. As agliconas encontradas são: sarsapogenin, markogenina, smilagenina, samogenina, gitogenina e neogitogenina (McALLISTER et al, 2001). Nesta planta pode ser encontradas estruturas monodesmosídicas (cadeia de açúcar ligada ao carbono C-3) ou bidesmosídicas (com cadeias ligadas ao carbono C-3 e C-26).

1.2.3 Atividade moluscicida

As espécies *Bulinus* e *Biomphalaria* (caramujos) atuam como hospedeiros intermediários no ciclo da doença esquistossomose. Muitos experimentos têm sido realizados em países africanos onde a prevalência da esquistossomose é elevada.

Assim como saponinas triterpênicas, as saponinas esteroidais também são conhecidas por possuir atividade moluscicida. Os glicosídeos bidesmosídicos não são ativos significativamente contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

O primeiro registro do uso de plantas para o controle da esquistossomose foi feito por Archibald, em 1933. Archibald observou que os frutos de *B. Aegyptiaca* eram empregados como veneno para peixes, no Sudão. Assim, estes frutos foram testados no controle do caramujo *B. snails* e conseqüentemente na cercária da esquistossomose. Mais tarde, descobriu-se que glicosídeos saponínicos derivados de yamogenina são os responsáveis por esta atividade (LIU; NAKANISHI, 1982).

A espécie *Agave decipiens* também foi testada contra o caramujo *Biomphalaria alexandrina*. A partir de extratos metanólicos desta planta foram isoladas duas saponinas espirostanas e duas furostanas. As agliconas presentes nestas saponinas são a neohecogenina e a neoruscogenina. Os compostos com os anéis espirostanos apresentaram relevante atividade moluscicida em relação aos compostos furostanos (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999).

1.2.4 Atividade antifertilidade

A atividade espermicida dos frutos *Balanites roxburghii* (Balanitaceae) tem sido atribuída a saponina diosgenina (FARNSWORTH; WALLER, 1982), embora esta atividade seja freqüentemente encontrada em glicosídeos triterpênicos. No entanto existem plantas que contêm saponinas esteroidais com essa ação, como exemplo, *Trigonella foenum graecum* (Leguminosae) (SETTY et al, 1976) e *Agave cantala* (PANT, 1988).

A planta *Paris poyphylla* var. *yannunenis* (Liliaceae) tem sido usada a mais de 500 anos na China como uma droga adaptógena. As duas saponinas com aglicona pennogenina isoladas de *P. polyphylla* também possuem forte atividade na contração do músculo uterino. Doses de 2 mg/kg, utilizadas em um experimento com ratos, foi suficiente para demonstrar esta contração (ZHOU, 1989).

1.2.5 Toxicidade e atividade antitumoral

O número de trabalhos sobre atividade citotóxica e antitumoral utilizando saponinas espirostanas vem aumentando nos últimos anos. As saponinas isoladas de espécies do gênero *Allium* foram avaliadas em experimentos para verificar atividade antitumoral. Os efeitos das saponinas esteroidais e suas sapogeninas foram utilizadas *in vitro* com um indutor de tumor incorporado nos fosfolipídios nas células HeLa. Todas as saponinas espirostanas foram ativas, incluindo a laxogenina e a agigenina isoladas dos bulbos de *Allium chinense* (MATSUURA et al, 1989).

Dois saponinas contendo como aglicona a diosgenina isoladas de *Paris polyphylla* (Liliaceae) apresentaram atividade citotóxica “*in vitro*” para seis tipos de células de câncer. Os resultados indicaram ED₅₀ para células P-388, 0,44 µg/mL;

células L-1210, 0,14 µg/mL, células KB 0,16 µg/mL ED₅₀ P-388, 0,22 µg/mL; L-1210, 0,43 µg/mL, KB 0,29 µg/mL (ZHOU, 1989).

O Afromontosídio, uma saponina furostana de *Dracaema afromontana* (Agavaceae) e o trillin (diosgenina 3β-glucosídeo) são citotóxicos para culturas de células KB em 100 µg/mL. A aglicona diosgenina e seus derivados dihidrodiosgenina são mais ativas e induzem a morte de células em uma concentração de 10 µg/mL (REDDY et al, 1984).

Os extratos das raízes da *Polygonatum Zanlanscianense* Pamp apresentam duas saponinas espirostanas, a protodiocina metilada e a dioscina. Estudos revelaram a atividade antitumoral destes compostos. Os resultados indicam que a dioscina exerceu inibição significativa no crescimento das células leucêmicas HL-60, induzindo a diferenciação e apoptose (WANG, 2001).

Os glicosídeos de yamogenina isolados das sementes de *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae) exibem atividade citotóxica contra células de linfócitos leucêmicas P-388, com valores de ED₅₀ de 0,41; 2,4; 0,21 µg/mL, respectivamente, no qual a diosgenina tetraglicosilada possui ED₅₀ com 0,21 µg/mL. Estes dados foram comparados com (ED₅₀ de 0,08 µg/mL) o agente quimioterápico 5-uracil (PETTI et al, 1991).

Recentes estudos revelam que a diosgenina, uma sapogenina espirostanas, altera o desenvolvimento do ciclo celular e induz a apoptose em células com osteosarcoma 1547 (MOALIC et al, 2001). Em outro estudo foram testadas estruturas semelhantes a diosgenina (hecogenina e tigogenina) com este tipo de célula revelando maior atividade da diosgenina em relação às demais estruturas (CORBIERE et al, 2003).

Trouillas e colaboradores (2005) identificaram regiões importantes na estrutura química de saponinas que têm em comum a aglicona diosgenina e atividade antiproliferativa. As regiões na estrutura compreendem as unidades de açúcar, a ligação dupla entre o carbono cinco e seis da sapogenina, a estereoquímica no C-25 e o anel espirostanos. As regiões imprecisíveis para a atividade antiproliferativa foram a presença do anel espirostanos e a dupla ligação entre os carbonos cinco e seis na aglicona a atividade antiproliferativa. Outro fato importante observado foi que a saturação entre os carbonos cinco e seis, com a

conformação β do hidrogênio no carbono cinco, por exemplo, induz a apoptose, entretanto o ciclo é interrompido em diferentes fases comparado com a diosgenina.

Wang e colaboradores (2007) relacionaram a atividade hemolítica e citotóxica de 63 saponinas esteroidais. Nestes compostos foram estudadas as seguintes características: o número de açúcares ligados a aglicona; o tipo de ligação entre os açúcares (α ou β) e o sítio de ligação destes açúcares; alterações na estrutura da aglicona e a substituição/alteração dos grupamentos hidroxilas dos resíduos de açúcar. Entre as saponinas testadas foi observado que as atividades hemolíticas e citotóxicas não são comuns simultaneamente na mesma saponina. Este fato sugere que as atividades são dependentes de suas estruturas químicas. Os resultados indicam que a quantidade de unidades de açúcares ligadas a agliconas congêneres (estruturalmente semelhantes) influencia na atividade hemolítica, ou seja, quanto maior o número de unidades açúcar maior será a atividade hemolítica. As ligações entre as unidades de açúcar em saponinas dissacarídicas congêneres (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 5), (1 \rightarrow 6) apresentaram atividade hemolítica semelhantes, entretanto a saponina congênere com ligação (1 \rightarrow 3) apresentou baixa atividade hemolítica. Este dado implica que o sítio de ligação entre os açúcares pode afetar significativamente a atividade hemolítica.

Wang e colaboradores (2001) observaram que a atividade hemolítica das saponinas esteroidais é modificada quando os grupamentos hidroxilas dos açúcares são substituídos. O aumento da cadeia do grupamento acila revelou pequena nesta atividade. Outra região observada influenciando na atividade hemolítica é a estrutura da aglicona. Os compostos que possuem dupla ligação entre os carbonos cinco e seis, saturação entre estes carbonos e a presença de oxidação no carbono dois na sapogenina indicaram leves alterações nesta atividade. A presença de cadeias carbônicas de C₁₂ e C₁₆ revelou redução na atividade hemolítica, entretanto as cadeias carbônicas com C₆ e C₁₀ mantiveram a atividade em comparação com o congênere sem essas estruturas.

Corroborando com Hostettmann e Marston (1995), Wang e colaboradores (2007) demonstraram que as saponinas espirostanas apresentam propriedade hemolíticas ao contrário das furostanas. Estes dados sugerem que as substituições/modificações dos grupos hidroxilas dos resíduos de açúcar podem afetar a atividade hemolítica diferentemente.

O mecanismo de ação da atividade antiproliferativa em células carcinogênicas humanas HCT-116 indicam que a diogenina esta envolvida na modulação da expressão da 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, uma enzima chave na via de biossíntese. Esse fato leva a uma redução dose-dependente da viabilidade e também do crescimento das células carcinogênicas (RAJU; BIRD, 2007).

Liagre e colaboradores (2004) observaram que a diosgenina participa no mecanismo de inibição do crescimento de fibroblastos sinoviais na artrite reumatóide, em humanos. O mecanismo está associado com o aumento da atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). Nesta avaliação um inibidor seletivo da COX-2 foi utilizado antes para provocar uma redução considerável, quando a diosgenina foi utilizada na indução da apoptose, mesmo na presença de prostaglandinas E₂ exógena. Quando foi utilizado a interleucina 1 β (IL-1 β), um indutor da COX-2, a indução apoptose pela diosgenina foi aumentado. Esse fato indica que os efeitos pro-apoptóticos estão associados com o aumento da expressão da COX-2 seguido do aumento da produção das prostaglandinas E₂. Também foi observado a fragmentação do DNA, ativação das caspase-3 e redução do potencial da membrana mitocondrial, fatores que implicam na apoptose.

1.2.6 Redutor da concentração de colesterol no plasma sanguíneo

Os estudos sobre os compostos ruscosídio A e ruscosideo B, isolados de *Ruscus hycanus* (Liliaceae) apresentam redução do nível de colesterol no sangue, da deposição de lipídios na aorta e da tensão arterial no fígado. Também foi observado redução no ritmo cardíaco e respiratório em coelhos e em humanos com arteriosclerose. Estas saponinas espirostanas também possuem atividade antiesclerótica e hipotensiva (SAUVAIRE et al, 1991).

As saponinas das sementes da *Trigonella foenum graecum* são ativas na redução dos níveis de colesterol em cães. Durante a passagem completa pelo trato digestivo, essas saponinas esteroidais são transformadas em diosgenina e gitogenina. As agliconas podem ser responsáveis junto com as saponinas, na inibição da absorção de colesterol, redução da concentração do colesterol no fígado e aumento da conversão do colesterol em ácidos biliares pelo fígado (SAUVAIRE et al, 1991).

1.2.7 Atividade antiinflamatória

A literatura relata atividade antiinflamatória de extratos de plantas que inibem edema induzidos por carragina. Por exemplo, os extratos metanólicos dos rizomas *Paris Polyphylla* S. M. var. *yunnanensis* (FR.) H-M (Liliaceae) apresentaram potencial inibitório de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos. Nesses extratos foram isolados sete compostos, sendo quatro saponinas esteroidais do tipo espirostano e três saponinas do tipo furostano (MATSUDA, 2003). As sapogeninas (agliconas) espirostanas isoladas foram a pennogenina e a diosgenina. Nesse estudo foram observadas as condições para exercer a atividade: unidades de açúcar ligada na posição C-3 e estrutura espirostanas. O grupamento hidroxila na posição C-17 aumenta os efeitos protetores nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (MATSUDA, 2003).

Entre as plantas com atividade antiinflamatória, as frações contendo saponinas das folhas de *Yucca schottii* Engelm. (Liliaceae) inibiram a indução de edema pela carragenina em ratos. Neste estudo foram isoladas seis saponinas com aglicona kammogenina (BACKER; BIANCHI; COLE, 1972).

A planta *Agave intermixta* Trel foi submetida a dois testes de atividade antiinflamatória em ratos. Um induzido por carragenina e outro induzido por acetato de tetradecanoforbol como agentes inflamatórios tópicos. Os extratos foram administrados oral e topicamente. Os resultados indicaram significativo efeito antiinflamatório (GARCIA et al, 2000).

A atividade antiinflamatória de extratos aquosos liofilizados da espécie *A. americana* L (Agavaceae) foi investigada. Destes extratos foram isolados sapogeninas esteroidais que foram submetidas a testes em animais com edema induzidos por carragenina. Os extratos e as geninas isoladas hecogenina e tigogenina foram administradas oral e intraperitonealmente. Os resultados indicam atividade relevante em relação aos padrões positivos utilizados (indometacina ou fosfato de dexametasona) (PEANA et al, 1996).

No mesmo estudo foi observado que nas doses administradas das geninas não apresentaram relevantes danos na mucosa gástrica em comparação com os danos causados por drogas usadas como padrão positivo (PEANA et al, 1996).

Os extratos de *Ruscus Aculeatus* Liliacea (rusco) têm importantes propriedades farmacológicas. As atividades mais notáveis são: antiinflamatória e no

tratamento da insuficiência venosa (VANHOUTTE, 1986). As investigações têm mostrado que as saponinas dos rizomas desta planta apresentam efeitos antiinflamatórios quando induzidos por carregenina em ratos após administração intraperitoneal (CAPRA, 1972). Os extratos do rusco também foram ativos em experimentos usando ratos com artrite induzida. A administração foi ativa tanto intraperitoneal quanto retal.

1.2.8 Redutor da permeabilidade vascular

O aumento da permeabilidade de macromoléculas entre as células endoteliais das veias pós-capilares é associado a reações inflamatórias e edema. As condições mais frequentes de insuficiência venosa são as veias varicosas (varizes) e as hemorróidas. As saponinas e sapogeninas das plantas *Aesculus hippocastanum* L., *Hedera helix* L, *Ruscus aculeatus* L. são conhecidas por serem efetivas no tratamento e prevenção da insuficiência venosa (MACKAY, 2001; FACINO et al, 1995).

O estudo sobre atividade dos compostos isolados das respectivas plantas indica redução da permeabilidade vascular através da atividade anti-elastase, que faz parte do sistema enzimático da degradação dos componentes estruturais. Entretanto, as geninas *R. aculeatus*, que apresentam o núcleo espirostanos, são inativas contra a hialuronidase (FACINO et al, 1995).

1.3 As saponinas espirostanas de Agave

A planta *Agave sisalana* Perrine é cultivada em larga escala no Nordeste brasileiro, e, devido à sua perfeita adaptação ao clima semi-árido e resistência à seca, acabou se transformando na principal cultura de várias áreas da região. O estado da Bahia é responsável por cerca de 95% da produção brasileira e mais de 50% do volume mundial (SANTOS, 2006; IBGE, 2009).

O gênero *Agave* pertence à família *Agavaceae* que compreende mais de 480 espécies. São encontradas nas regiões áridas e tropicais. Entre as 310 espécies existentes no continente americano, 272 encontram-se no México, considerado o país de origem desse vegetal. A ocorrência de saponinas esteroidais nesta família,

principalmente nos gêneros *Agave* e *Yucca*, são bem documentados (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED,1999; SATI et al, 1985; VARSHNEY; JAIN; SRIVASTAVA, 1981).

No Brasil, a principal utilização das espécies de agave consiste na extração das fibras contidas em suas folhas (*Agave sisalana*), dando origem à principal fibra dura produzida no mundo, contribuindo com mais da metade da produção comercial de todas as fibras desse tipo (OASHI, 1999). Outro produto obtido das espécies de *Agave* são as sapogeninas, úteis na indústria de esteroides. A estimativa das sapogeninas hecogenina e tigogenina em folhas de sisal são de 0,2% e 0,035%, respectivamente (DAWIDAR; FAYEZ, 1961; CALLOW, CORNFORTH; SPENSLEY, 1951).

Em escala comercial (fibras naturais) somente duas espécies são cultivadas: *Agave sisalana* (sisal) e *A. fourcroydes* (henequém), que adquiriram importância econômica mundial, sendo a primeira a mais plantada pelos países produtores de fibras, inclusive o Brasil e a segunda é muito cultivada no México. (OASHI, 1999)

As espécies *Agave salmiana* e *A. atrovirens* são utilizadas na produção do “pulque”. *A. potatorum* e *A. angustifolia* são utilizadas para a produção do “mezcal” e *A. tequilana* Weber para produção de tequila. A tequila e o “pulque” são bebidas alcoólicas manufaturadas a partir da “piña” (caule sem as folhas de *Agave*), seguida de um cozimento para converter os polissacarídeos (inulina) em uma mistura de frutose e glicose (PEÑA-ALVAREZ et al,2004).

A literatura apresenta uma grande quantidade de trabalhos sobre a extração de saponinas de *Agave*. A maioria desses trabalhos apresenta uma seqüência de eventos como a retirada das graxas do material vegetal, obtenção do concentrado de saponinas, hidrólise das saponinas e a extração das sapogeninas liberadas no processo de hidrólise, entre outros (KINTIA et al, 1975; BLUNDEN, CARABOT; JEWERS, 1980; SHARMA: SATI, 1982; SATI et al, 1985; SATI et al, 1987; ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED,1999; DING, Y. et al, 1989; DING, Y. et al, 1993; ABDEL-KALINK et al, 2002; JIN et al, 2002; MIMAKI; YOKOSUKA, 2007).

A retirada das graxas do material vegetal de *Agave* tem como objetivo eliminar compostos lipídicos que podem afetar as etapas seguintes. A retirada pode ser realizada diretamente ou nos extratos obtidos destes materiais.

Abdel-gawad, El-Sayed e Abdel-Hameed (1999) para isolarem as saponinas das folhas de *Agave decipiens* Baker realizaram extrações com éter de petróleo para

retirar compostos lipofílicos. Após este passo as folhas foram extraídas com metanol e seu volume foi reduzido. O objetivo desta etapa foi concentrar os componentes de interesse, *i.e.* as saponinas (compostos polares). Em seguida o resíduo metanólico foi ressuspenso em água e extraído sucessivamente com clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, por partição. Nesta etapa o processo de pré-purificação utilizou a partição entre solventes imiscíveis para remover ou reduzir os contaminantes sejam eles polares ou apolares. Outro aspecto é a recuperação dos compostos (saponinas), que ocorre de forma quantitativa.

Ohtsuki e colaboradores (2004) para isolar uma nova saponina em *Agave fourcroydes* realizaram repetidas cromatografias de colunas reversas, em contraste com Abdel-gawad (1999). O processo iniciou com a extração das folhas com metanol. Em seguida realizaram uma cromatografia com a resina Diaion HP 20 do extrato metanólico anterior para retirar as clorofilas. O extrato metanólico isento de clorofilas foi submetido à partição com acetato de etila e n-butanol sucessivamente. Os resíduos de cada solvente foram submetidos à CC utilizando octadecilsilano - ODS (coluna A) e gradiente de metanol e água (1:1) à 100% metanol como eluente. A fração com 80% de metanol obtida foi submetida a outra CC com ODS (coluna B) e gradiente de 60 a 75% metanol e água como eluente. A fração 70-75% metanol e água (coluna B) foi submetida à CLAE e foram identificadas as saponinas **8** e **12**. A fração com 70% de metanol (coluna A) foi submetida em outra CC ODS (coluna B) e utilizando gradiente 65 a 75% metanol. A fração com 65% metanol (coluna B) foi analisada em CLAE e identificou a saponina **11**.

Na identificação estrutural de saponinas de *Agave* destacam as técnicas clássicas de identificação de compostos orgânicos como os métodos espectroscópicos de ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), espectrometria de massas. A tabela 3 e 4 apresentam as estruturas químicas e os dados físicos e espectrométricos destas saponinas, respectivamente.

As diferentes funções oxigenadas presentes nas saponinas espirotanas podem ser facilmente detectadas pela espectroscopia de infravermelho. São obtidos os dados sobre as absorções carboniladas das cetonas, e hidroxilas dos açúcares. O estiramento C-O (álcool) na faixa de $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ sugere a presença de componentes com açúcar. Outros estiramentos característicos são os sinais característicos do anel F que apresentam estiramento a $850, 900, 920$ e 985 cm^{-1} . A

intensidade do estiramento em 900 cm^{-1} maior que em 920 cm^{-1} indica que a sapogenina pertence a serie *iso* (25S). O inverso, ou seja, a intensidade do estiramento em 900 cm^{-1} menor que em 920 cm^{-1} indica que a sapogenina pertence a serie *neo* (25R) (EDDY, WALL; SCOTT, 1953).

Abdel-kalink e colaboradores (2002) atribuíram à estrutura de uma saponina espirostanas em *Agave lophanta* os dados do estiramento em: 3420; 2930; 1050; 980, 920; 900; 863 cm^{-1} . Ding e colaboradores (1993) identificaram as saponinas espirostanas de *Agave sisalana* com os dados de 985, $920 < 900$ (em intensidade) e 870 cm^{-1} : referentes ao esteróide espirostanos 25R e a absorção do grupamento hidroxila em 3440-3460 e 1050-1080 cm^{-1} . Mimaki e Yokosuka (2007) observaram os estiramentos de: 3398 (OH), 2926 (CH), 1069, 1024 cm^{-1} (OH). Estes dados indicam que a tigogenina é a porção apolar destas saponinas.

Abdel-Gawad, El-Sayed e Abdel-Hameed (1999) elucidaram a estrutura de uma saponina espirostanas presente em *Agave decipiens* Baker. Através dos dados de absorção em 3419 cm^{-1} (indicando presença de OH); 1704 cm^{-1} (carbonila em um anel de seis unidades) e uma absorção de 919 e 896 cm^{-1} (característica de [25S] espirocetal). Os dados sugerem a hecogenina como porção apolar desta saponina.

Outra técnica analítica importante na elucidação estrutural é a espectrometria de massas. O espectro de massas de uma sapogenina esteroidal permite identificar o sistema de anéis, a natureza e a possibilidade de localização de um substituinte. Os métodos de ionização mais utilizados na espectrometria de massas para as saponinas são: ionização química (CI-MS) e o bombardeamento rápido de átomos (FAB-MS).

As sapogeninas esteroidais espirostanas apresentam um padrão de fragmentação no qual o sistema espiro origina todos os fragmentos importantes, ou seja, apresentando uma carga ou eliminado como fragmento neutro. O pico base para maioria dos compostos, entre os quais a tigogenina, diosgenina, hecogenina, sarsapogenina apresenta um valor $m/z = 139$. Outra fragmentação importante é o sinal em $m/z = 115$. Outros sinais observados são m/z 271, 285, 300, 342, 345, 355 (DJERASSI, 1970; DING et al, 1993).

Uma saponina espirostanas obtida em *Agave decipiens* (figura 4) apresentou, no modo CI-MS, o íon molecular m/z 1211 [$M^+ + 29$], os fragmentos m/z 1050 [$M^+ - \text{Xyl}$], 753 [$M^+ - 2x \text{Xyl-Glc}$] que indicam as unidades xilose e a glicose são terminais.

Outros fragmentos m/z 591.4 [M^+ 2x Xyl-2xGlc] e m/z 429 [M^+ - 2x Xyl-2xGlc- Gal] indicam a perda de duas unidades de xilose, duas de glicose e uma de galactose. A análise dos dados sugere que a galactose é diretamente ligada a aglicona (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED,1999).

Outra saponina espirostana em *Agave decipiens* apresentou, no modo CI-MS os fragmentos m/z 1050 [M^+ -Xyl], 887 m/z [M^+ - Xyl- Glc] referente às unidades terminais de açúcar xilose e glicose. Outros fragmentos m/z 753.5 [M^+ - 2x Xyl- Glc] m/z 591[M^+ - 2x Xyl- Glc] demonstram a perda de duas unidades de xilose, uma de glicose. O fragmento m/z 429 [M^+ - 2x-Xyl - 2xGlc - Gal] indica que a aglicona (*neohecogenina*) é diretamente ligada a galactose (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED,1999).

A saponina espirostana presente em *Agave sisalana* foi identificada pelo método de bombardeamento rápido de átomos (FAB), exibiu um pico molecular m/z 1033 [M - H], no modo negativo. Os fragmentos m/z 901 [M - pentose], m/z 871 [M - hexose], 739 m/z [M - pentose - hexose] e 577 m/z [pentose - 2x - hexose] observados remetem que esse composto apresenta uma unidade de xilose e tres unidades de uma hexose (galactose e glicose). A identificação da saponina acetilada em EIMS apresentou os fragmentos 835 m/z ([pentose - 2x - hexose] Ac₉), 331 m/z [hexose - Ac₄], 259 [pentose Ac₃] (DING et al, 1989).

As saponinas espirostanas podem ser detectados com ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo utilizando como fase móvel metanol ou acetonitrila. Outro aspecto é que nesta técnica as saponinas furostanas não apresentam uma boa resolução em CLAE, quando utiliza metanol como fase móvel (KITE, 2007).

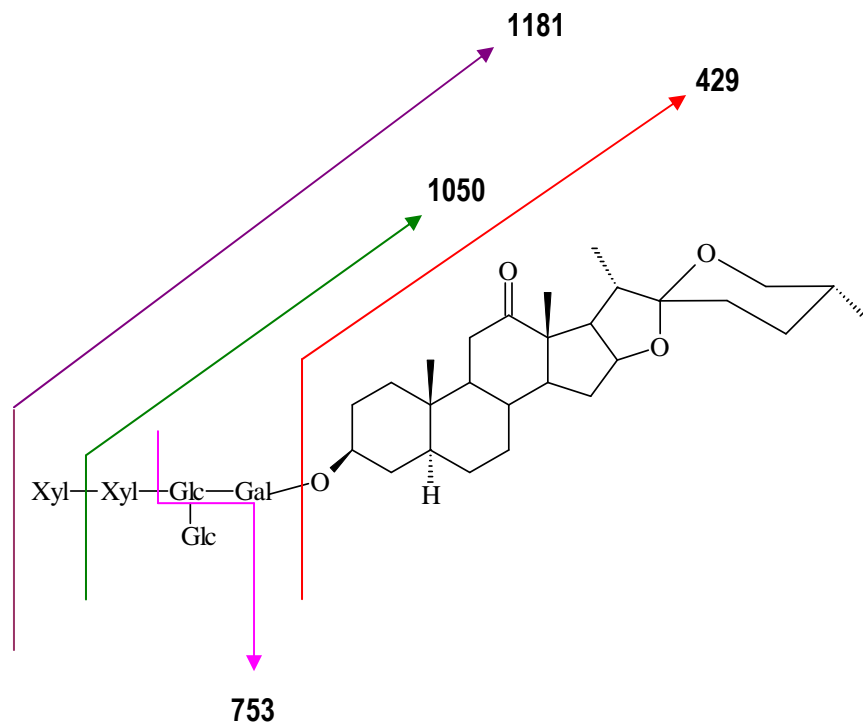


Figura 4. Produção de íons m/z de uma saponina em *Agave decipiens*, por ionização química.

Diversas plantas de *Agave* utilizadas na medicina popular apresentam em sua composição química saponinas espirostanas. A Tabela 2 apresenta as principais atividades biológicas de espécies de *Agave* que apresentam saponinas espirostanas em sua composição.

Tabela 2. Atividades biológicas de espécies de *Agave* (Agavaceae).

Planta	Atividade biológica	Referências
<i>Agave americana</i>	Hipocolesterolemia Antiinflamatória	KINTIA et al, 1996 PEANA et al,1996
<i>A. decipiens</i>	Moluscicida	ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999
<i>A.intermixta</i>	Antiinflamatória	GARCIA, et al, 2000.
<i>A. sisalana</i>	Antifúngica	UJIKAWA; PURCHIO, 1989. SANTOS et al, 2009
<i>A. fourcroydes</i>	Citotóxica	OHTSUKI et al,2004

REFERÊNCIAS

ABDEL-GAWAD, M. M.; EL-SAYED, M. M; ABDEL-HAMEED, E. S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**. v. 70. p. 371-381, 1999.

ABDEL-KALINK, S.M. et al. New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation. **Pharmazie**. v.57 p. 562-566, 2002.

AGRAWAL, P. K; PATHAK, A.K. Nuclear magnetic resonance spectroscopic approaches for the determination of interglycosidic linkage and sequence in oligosaccharides. **Phytochemical analysis**.v. 7. p. 113-130, 1996

ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. (Coord.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre-Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

ATTELE, S. A., WU, J. A., YUAN, C.-S. Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. **Biochemical Pharmacology**. v. 58. p. 1685–1693, 1999.

BABA, M. et al. Saponins isolated from *Allium chinense* G.Don and antitumor-promoting activities of isoliquiritigenin and laxogenin from the same drug. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 23. p. 660–662, 2000.

BALANDRIN, M.F. Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. **Advances in experimental medicine and biology**; v. 404.p.1-14, 1996.

BARILE, E. et al. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**. v.68.p.596–603, 2007.

BACKER, R. C.; J. R. A phytochemical investigation of *Yucca schottii* (Liliaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 61(10). p. 1665-1666, 1972.

BLUNDEN, G.; CARABOT, A. C.; JEWERS, K. Steroidal saponins from leaves of some species of *Agave* and *Furcraea*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2489-2480, 1980.

CALLOW, R.K.; CORNFORTH, J.W. & SPENSLEY, P.C. A source of hecogenin. **Chemistry and Industry**, London, n.33:699-700, 1951.

CAPRA.C.Pharmacology and toxicology of some components of *Ruscus aculeatus*. **Fitoterapia**. v. 43. p. 99-113, 1972.

CORBIERE, C. *et al.* Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells **International Journal of Oncology**. v. 22.p.899-905, 2003.

COSTA, A. F. Fármacos com saponósidos. In: _____Farmacognosia. v.2. ed. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.338-357, 2001.cap 3.

DAWIDAR, A.A: FAYEZ, M.B. Steroid sapogenis. III. Distribution of steroid sapogenins in the sisal plant. **Arch Biochem Biophys**. v. 92 p. 420-423, 1961.

DING, Y. *et al.* Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*. **Phytochemistry**. v. 28. p. 2787-2791, 1989.

DING, Y. *et al.* Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. **Chem-Pharm-Bulletin**(Tokyo). v.41 n.3. p. 557-560,1993.

DJERASSI, C. Applications of mass spectrometry in the steroid field. **Pure Appl. Chem**. v. 21, n. 2, p. 205-226, 1970.

EDDY, C. R. WALL, M. E; SCOTT, M. K. Catalog of Infrared Absorption Spectra of Steroidal Sapogenin Acetates. **Analytical Chemistry**. v. 25.n. 2.p 266-271, 1953.

ESTRADA, A. *et al.* Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. v. 23. p. 27-43, 2000.

FACINO, R. M. *et al.* Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. **Archiv der Pharmazie**.v. 328.(10). p. 720-724, 1995.

FARNSWORTH, N. R, WALLER D. P. Current status of plant products reported to inhibit sperm. **Res Front Fertil Regul.** v. 2 (1). p. 1-16, 1982.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition.** v. 88. p.587-605, 2002.

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. (3) p. 395-400, 2000.

HERLT, A. J. et al. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae. **Journal of Natural Products.** v. 65. p. 115–120, 2002.

IBGE, **Censo Agropecuário**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 10 de Junho de 2009

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**: Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

HUFFORD, C. D.; LIU, S.; CLARK, A. M. Antifungal activity of *Trillium grandiflorum* constituents. **Journal of Natural Products.** v. 51. n. 1. p. 94-98, Jan-Feb, 1988.

JIN, J. M. et al. Two New steroidal glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. **Chinese Chemical Letters.**v. 13. n. 7. p. 629 – 632, 2002.

KANZAKI, T. et al. Role of transforming growth factor- pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. **British Journal of Pharmacology.** v. 125. p. 255–.262, 1998.

KILLEEN *et al.*,. Antimicrobial Saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 46.p. 3178–3186, 1998.

KINTIA, P. K; BOBEYKO, V.A; WILKOMIRSKI, B. New steroidal saponins of *Agave americana*. **Phytochemistry.** v.14. p 2657-2659, 1975

KITE, G.C. et al. Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1148 p. 177–183, 2007

LIAGRE, B. *et al.* Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. **Arthritis Research & Therapy** v. 6.n. 4, 2004.

LIU, H.-W.; NAKANISHI, K. The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptica*. **Tetrahedron**.v. 21.p. 3633-3639, 1965.

MAcKAY, D. Hemorrhoids and varicose veins: a review of treatment options. **Altern Med Ver.** v. 6(2). p. 126-40 Apr. 2001

MARKER, R. E.; LOPEZ, J. Steroidal Sapogenins. No. 171. Biogenesis of the Steroidal Sapogenins in Agaves, Manfreda and Hesperaloe. **Journal of the American Chemical Society**.v. 69 (10) p. 2403–2404, 1947.

MATSUDA, H *et al.* Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. yunnanensis on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 13(6). p. 1101-1106, 2003.

MATSUURA, H. *et al.* A furostanol glycoside from *Allium chinense* G. Don. **Chem Pharm. Bull.** v. 37.p. 1390–1391, 1989

MATSUURA, H. Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease. **J. Nutricion**.v. 131. p. 1000-1005, 2001.

McALLISTER, T. A. *et al.* Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. **Vet Parasit.** v. 97. p. 85–99, 2001.

MIMAKI, Y ; YOKOSUKA, A . Steroidal Glycosides from *Agave utahensis*. **Chem. Pharm. Bull.** V. 55(1) p. 145—149, 2007

MIYARARA, K. *et al.* Co-ocurrence and high performance liquid chromatographic separation of the glycosides of rhodeasapogenin and its analogs which differ in the F-ring structure. **Chem. Pharma. Bulletin.** p. 348-351, 1983.

MOALIC, S *et al* . A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. **Federation of European Biochemical Societies**. Letters. v. 506. p. 225-230, 2001.

OASHI, M. C. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**.UFSC,1999. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999. Acessado em 23/09/2008 Em: <http://www.eps.ufsc.br/teses99/oashi/>.

OHTSUKI *et al*. New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** .v. 12 p. 3841–3845, 2004.

OKUNJI, C. O. *et al*. Biological activity of saponins from two *Dracaena* species. **Adv Exp Med Biol**.v.404.p.415-428, 1996.

OLESZEK , W; BIALY Z. Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005) **Journal of Chromatography A**. v. 1112.p. 78–91, 2006.

_____. An antifungal spirostanol saponin from fruit pulp of *Dracaena mannii*. **Int J. crude drug Res**. v. 28. p 193-199, 1990.

PANT, G. *et al*. Structure elucidation of a spirostanol glycoside from *Aspatagus officinalis* fruits by concerted use of two-dimensional NMR techniques. **Mag.Reson. Chem**.v. 26. p. 911-918, 1988.

PETTIT, G. R. *et al*. Isolation and structure of cytostacty steroidal saponins from the Africam medicinal plant *Balanites aegytiaca*. **Journal of Natural Products**. v. 54. p. 1491-1502, 1991

PEANA, A. T. *et al*. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. **Planta Medica**.v. 63(3). p. 199-202. jun, 1997.

PEÑA-ALVAREZ *et al.*, Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1027 p. 131–136, 2004

RAJU, J.; BIRD, R. P. Diosgenin, a naturally occurring spirostan saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. **Cancer Letters**. v. 255 (2). p. 194-204, 2007.

SANTOS, J. D. Produção e consumo/Production and consumption. In: ANDRADE, Wilson (Org. e Coord.). O Sisal do Brasil/ Brazilian Sisal. Salvador: SINDIFIBRAS, 2006.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana* . **African Journal of Biotechnology**.v. 8 (22). p. 6181-6184, 2009.

SAUTOUR, M. et al. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. **Planta Medica**. v. 70. p.90–92, 2004.

SATI, O.P; SHARMA, S. C. A spirostanol glycoside from *Agave cantala*. **Phytochemistry**. v.21. p. 1820-1821, 1982.

SATI, O. P. et al. Cantalasaponin- 1, a novel spirostanol bisdesmoside from *Agave cantala*. **Journal Natural Products**; v. 48 n. 3 p. 395-399, 1985.

SATI, O. P; RANA, U; CHAUKIYAL, D.C. A new spirostanol glycoside from *Agave cantala*. **Journal of Natural Products**. v.50. p. 263-265, 1987.

SAUVAIRE, Y. et al. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. **Lipids**. v. 26. n. 3. p.191-197, 1991.

SAXENA, V. K.; SHALEM, A. Yamogenin 3-O-β-D-glucopyranosyl (1-4) – O – α – D-xylopyranoside from the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. **Journal Chem. Sci.**, v. 116. n.2. p. 79-82, 2004.

SETTY, B. S. et al. Spermicidal potential of saponins isolated from Indian medicinal plants. **Contraception**. v. 14(5). p. 571-578, 1976

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E; STADEN, J. van. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, 2004.p. 219-243.

TAKECHI, M ; TANAKA, Y. Structure-activity relationships of synthetic diosgenyl monoglycosides. **Phytochemistry**. v. 30. n.8. p. 2557-2558, 1991.

TRAN, Q. L. et al. Triterpene saponins from *Vietnamese ginseng* (*Panax vietnamensis*) and their hepatocytoprotective activity. **Journal of Natural Products**. v. 64. p. 456–461, 2001

TROUILLAS, P. *et al.* Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13. p. 1141–1149, 2005.

UJIKAWA, K; PURCHIO , A. Substâncias Antifúngicas, inibidoras de *Aspergillus flavus* e de outras espécies fúngicas, isoladas de *Agave sisalana* (sisal). **Ciência e Cultura**; v. 41. (12). p.1218-1224, 1989.

VANHOUTTE, P. M. *Advances in Medicinal Phytochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc. v. 23.p. 187-194, 1986

VARSHNEY, I. P.; JAIN, D. C; SRIVASTAVA H. C. Cantalanin-A, a new saponin from the leaves of *Agave cantala*. **Journal Natural Products**.v. 44 n.6 p.662-663, 1981.

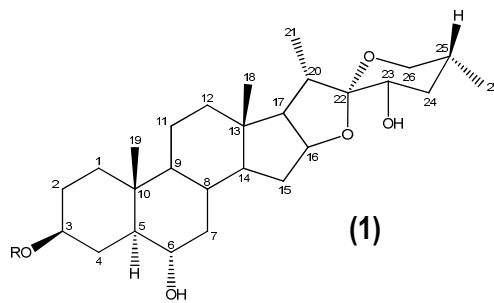
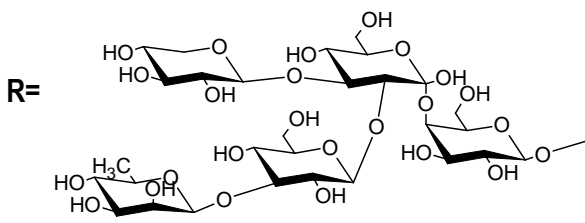
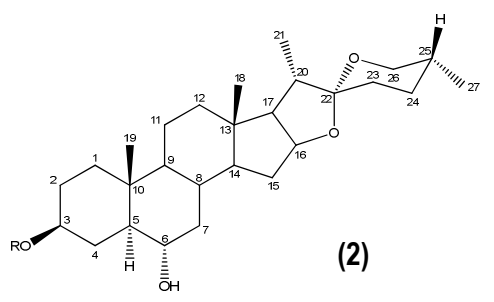
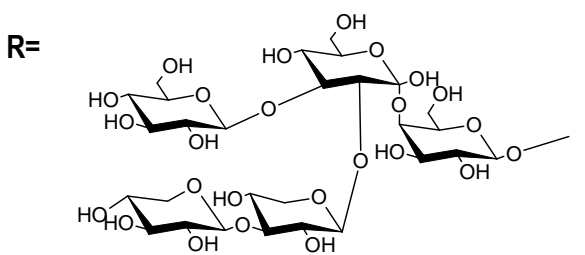
WANG, Y. *et al.*, Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**.v.15.p .2528–2532. fev, 2007.

WANG, Z. Effects of Two Saponins Extracted from the *Polygonatum Zanlanscianense* Pamp on the Human Leukemia (HL-60) Cells **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 24. n.2. p.159, 2001.

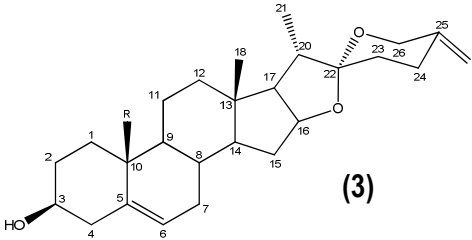
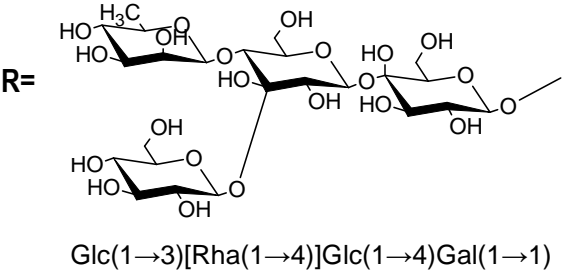
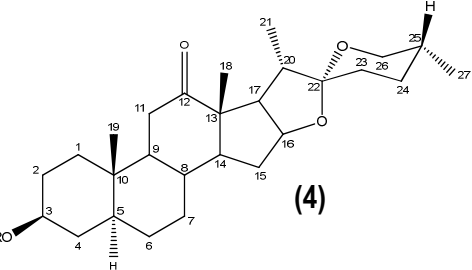
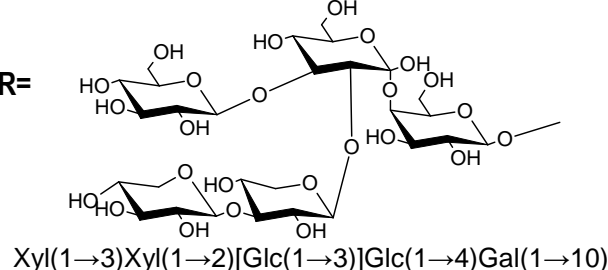
YANG, C. R. *et al.* Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**.v.50(5).p.1710-1714, 2006.

ZHOU, J. Some bioactive substances from plants of West China. **IUPAC Pure & Appl. Chem**.v.61n.3p.457-460, 1989.

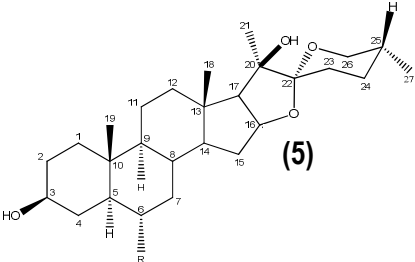
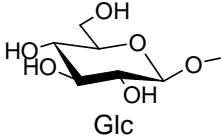
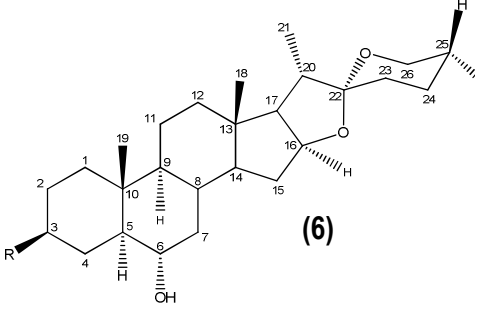
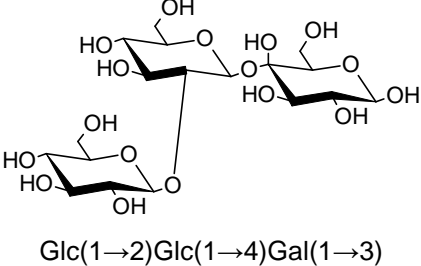
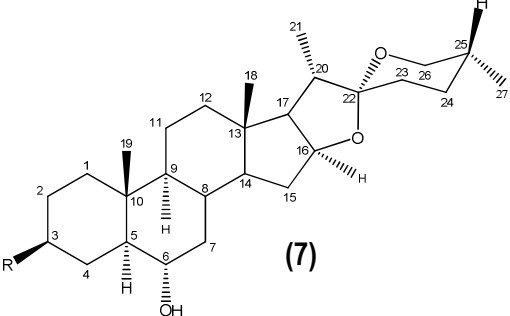
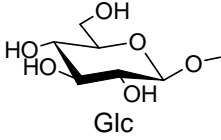
Tabela 3: Estruturas químicas das saponinas e sapogeninas espirostanas em *Agave*.

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. americana</i>	 <p>(1)</p>	<p>R=</p>  <p>Rha(1→3)Glc(1→2)[Xyl(1→3)]Glc(1→4)Glc(1→3)</p>	JIN et al, 2002
<i>A. americana</i>	 <p>(2)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc(1→2)[Xyl(1→3)]Glc(1→4)Glc(1→3)</p>	JIN et al, 2002

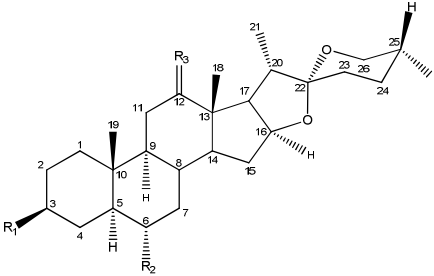
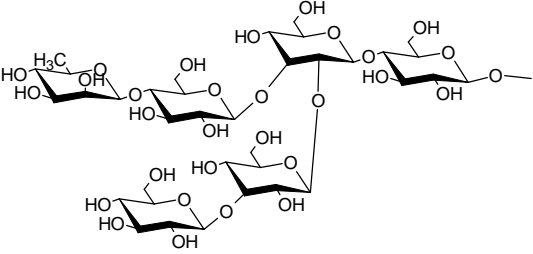
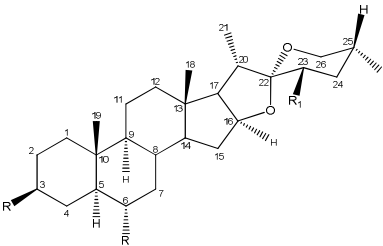
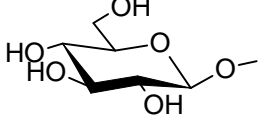
Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. decipiens</i>	 <p style="text-align: right;">(3)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc(1→3)[Rha(1→4)]Glc(1→4)Gal(1→1)</p>	ABDEL-GAWAD et al, 1999
<i>A. decipiens</i>	 <p style="text-align: right;">(4)</p>	<p>R=</p>  <p>Xyl(1→3)Xyl(1→2)[Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→10)</p>	ABDEL-GAWAD et al, 1999

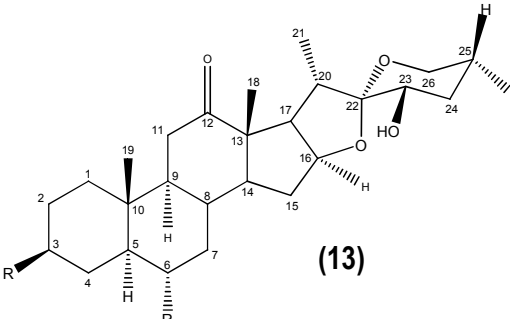
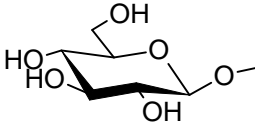
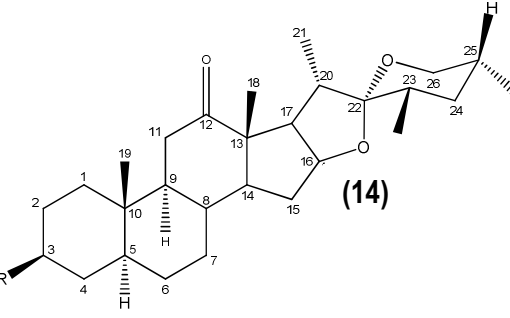
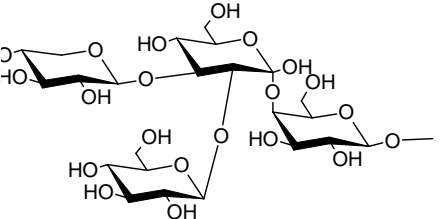
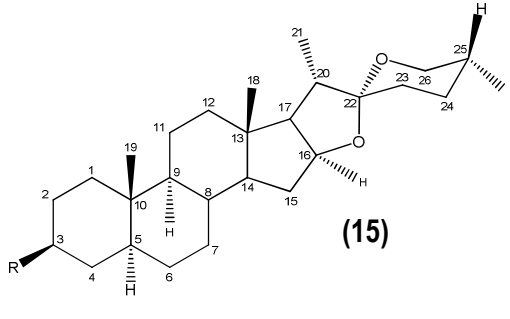
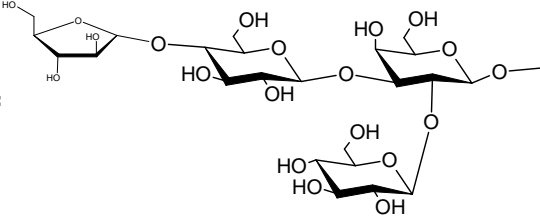
Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. utahensis</i>	 <p>(5)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc</p>	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007
<i>A. utahensis</i>	 <p>(6)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc(1→2)Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007
<i>A. utahensis</i>	 <p>(7)</p>	 <p>Glc</p>	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007

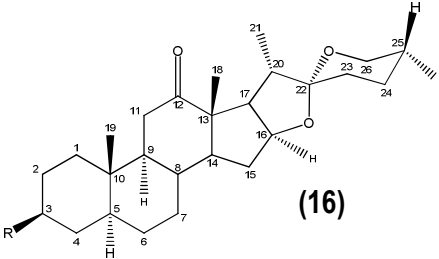
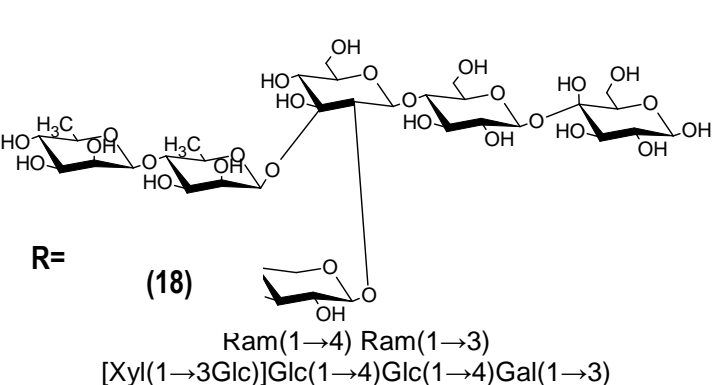
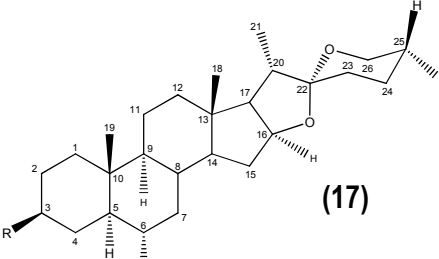
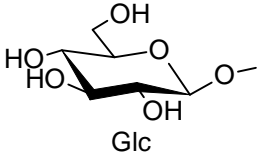
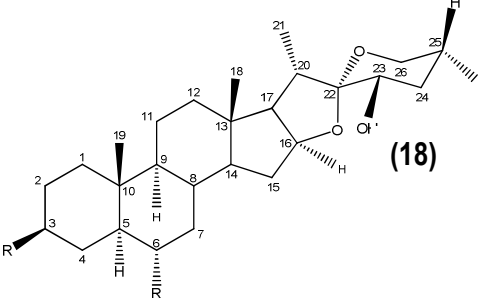
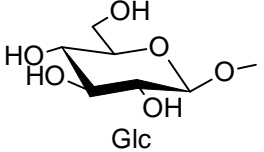
Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. fourcroydes</i>		<p data-bbox="1050 475 1093 501">R=</p>  <p data-bbox="1050 762 1765 794">Rha(1→4)Glc(1→3)[Glc(1→3)Glc(1→2)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	OHTSUKI et al, 2004
<i>A. fourcroydes</i>		<p data-bbox="1099 938 1142 963">R=</p>  <p data-bbox="1384 1066 1435 1086">Glc</p>	OHTSUKI et al, 2004

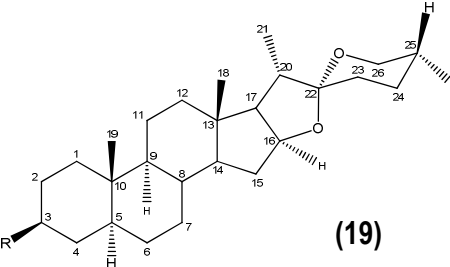
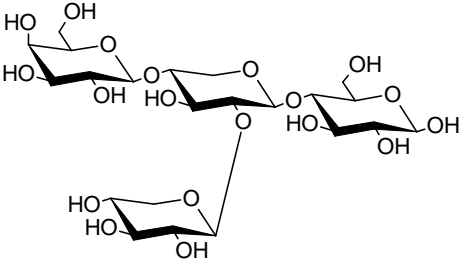
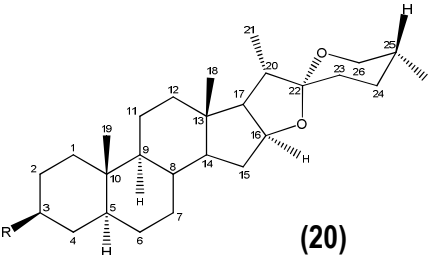
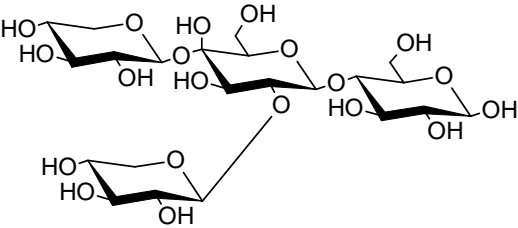
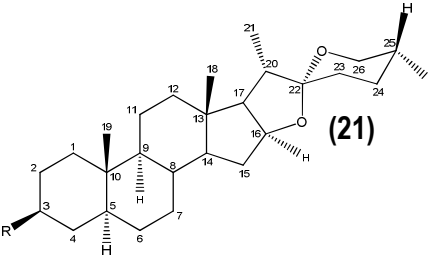
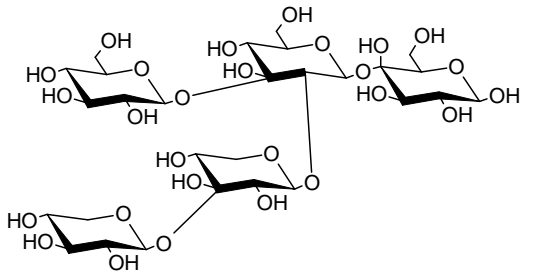
Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. sisalana</i>	 <p>(13)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc</p>	CHEN, LEE, 2007
<i>A. sisalana</i>	 <p>(14)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc(1→2)[Xyl(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	CHEN, LEE, 2007
<i>A. lophanta</i>	 <p>(15)</p>	<p>R=</p>  <p>Apio (1→4)Glc(1→3)[Glc(1→2)]Gal(1→3)</p>	ABDEL-KALINK et al, 2002

Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. americana</i>	 <p>(16)</p>	 <p>R= (18)</p> <p>Ram(1→4) Ram(1→3) [Xyl(1→3Glc)]Glc(1→4)Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	KINTIA et al, 1975
<i>A. cantala</i>	 <p>(17)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc</p>	SHARMA: SATI, 1982
<i>A. cantala</i>	 <p>(18)</p>	<p>R=</p>  <p>Glc</p>	SATI et al, 1985

Continuação

Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. cantala</i>	 <p>(19)</p>	 <p>Xil(1→2)[Gal(1→2)]Glc(1→4)Glc(1→3)</p>	SATI et al, 1987
<i>A. sisalana</i>	 <p>(20)</p>	 <p>Xil(1→2)[Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	DING et al, 1989
<i>A. sisalana</i>	 <p>(21)</p>	 <p>Xil(1→3)Xyl(1→2)[Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	DING et al, 1989

Continuação

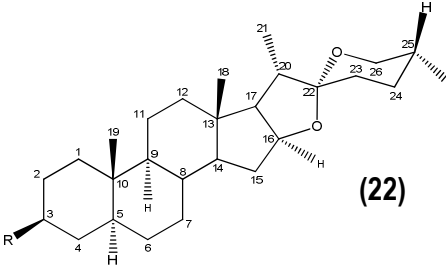
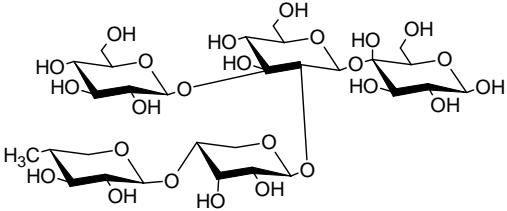
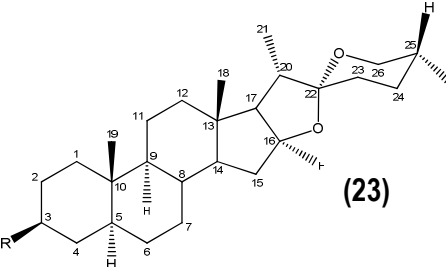
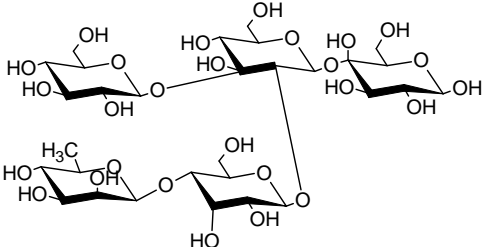
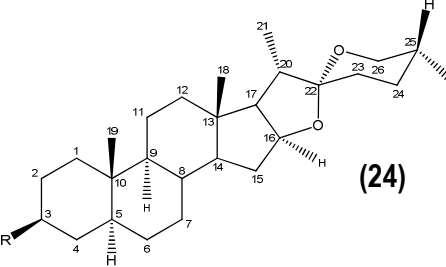
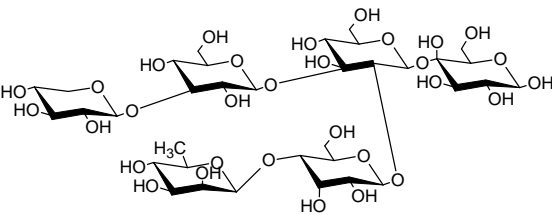
Planta	Aglicona	Açúcares	Referência
<i>A. sisalana</i>	 <p>(22)</p>	 <p>Ram(1→4) Xil (1→2)[Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	DING et al, 1989
<i>A. sisalana</i>	 <p>(23)</p>	 <p>Ram(1→4) Glc (1→2)[Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	DING et al, 1993
<i>A. sisalana</i>	 <p>(24)</p>	 <p>Ram(1→4) Glc (1→2) [Xil(1→3)Glc(1→3)]Glc(1→4)Gal(1→3)</p>	DING et al, 1993

Tabela 4: Dados espectrais e físicos de saponinas espirostanas isoladas em *Agave*.

Fonte	Estrutura	pf(°C) / [α] _D (°)	Dados espectrais	Referência
<i>Agave americana</i>	Agamenoside A (1)	- / - 47,62	¹ H, ¹³ C, 2D, FABMS, 1211 [M-H] ⁻	JIN et al, 2002
<i>A. americana</i>	Agamenoside B (2)	- / - 53,04	¹ H, ¹³ C, 2D, FABMS, 1049[M-H]	JIN et al, 2002
<i>A. decipiens</i>	(3)	255 - 257 / -	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D CI-MS 1061 [M-H] ⁻	ABDEL-GAWAD et al, 1999
<i>A. decipiens</i>	(4)	248 - 250 / -	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D CI-MS 1181,9 [M-H] ⁻	ABDEL-GAWAD et al, 1999
<i>A. utahensis</i>	(5)	- / - 34	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D HR-ESI-TOF-MS 795,41 [M+Na] ⁺	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007
<i>A. utahensis</i>	(6)	- / - 34	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D HR-ESI-TOF-MS 941,47 [M+Na] ⁺	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007
<i>A. utahensis</i>	(7)	- / - 18	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D HR-ESI-TOF-MS 617,36 [M+Na] ⁺	MIMAKI; YOKOSUKA, 2007
<i>A. fourcroydes</i>	(8)	- / - 16,6	, IV, ¹ H, ¹³ C, HR- FABMS 1411,63 [M +Na] ⁺	OHTSUKI et al, 2004
<i>A. lophanta</i>	(15)	- / -49,5	IV, ¹ H, ¹³ C, 2D FABMS 1057 [M +Na] ⁺	ABDEL-KALINK et al, 2002

Continuação

Fonte	Estrutura	pf(°C) / [α] _D (°)	Dados espectrais	Referências
<i>A. americana</i>	Agavasaponin E (16)	304 - 308 / - 130,0	¹ H, ¹³ C,	KINTIA et al, 1975
<i>A. cantala</i>	(17)	245 - 246 / - 78,0	-	SHARMA: SATI, 1982
<i>A. cantala</i>	Catalasaponin- 1(18)	243 - 245 / - 51,5	IV ¹ H, ¹³ C, FABMS 811 [M +Na]	SATI et al, 1987
<i>A. cantala</i>	(19)	301 - 304/ -	¹ H, ¹³ C, 2D, FABMS 1166 [M-H] ⁻	SATI et al, 1985
<i>A. sisalana</i>	Dongnoside E (20)	250 - 253 / - 58,82	, IV ¹ H, ¹³ C, FABMS 1033 [M-H]	DING et al, 1989
<i>A. sisalana</i>	Dongnoside D (21)	257 - 260 / - 45,45	, IV ¹ H, ¹³ C, FABMS 1165[M-H] ⁻	DING et al, 1989
<i>A. sisalana</i>	Dongnoside C (22)	236 - 239 / - 62,00	IV ¹ H, ¹³ C, FABMS, 1179[M-H] ⁻	DING et al, 1989
<i>A. sisalana</i>	Dongnoside A (23)	265 - 270 / -51,5	IV ¹ H, ¹³ C,2D, FABMS 1341[M-H] ⁻	DING et al, 1993
<i>A. sisalana</i>	Dongnoside B (24)	275 - 277 / - 50,08	IV ¹ H, ¹³ C, 2D, FABMS 1209 [M-H] ⁻	DING et al, 1993

CAPÍTULO 1

Atividade antimicrobiana de *Agave sisalana*¹

¹ Este capítulo foi aceito para publicação pelo periódico *African Journal of Biotechnology*

RESUMO

Neste estudo procedeu-se a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Agave sisalana* obtidos a partir das folhas e do resíduo de sisal, descartado no processo de beneficiamento para obtenção de fibras duras. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em disco de papel utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (resistentes e não-resistentes a antibióticos) e um fungo. Os extratos apresentaram significativa inibição de *Candida albicans*, por outro lado, foram inativos para os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. O extrato metanólico das folhas apresentou fraca redução da ação inibitória de *C. albicans* quando comparado com os demais extratos, sendo também inerte para os outros microorganismos testados.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, atividade antimicrobiana, *Candida Albicans*.

Antimicrobial activity of *Agave sisalana*

Jener D. G. Santos¹, Alexsandro Branco^{1,*}, Alice F. Silva², Carla S. R. Pinheiro²,
Aristóteles Góes Neto², Ana P. T. Uetanabaro³, Sandra R. O. D. Queiroz⁴,
Juan T. A. Osuna⁴

¹ Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS, Av. Transnordestina s/n, 44036-900 Feira de Santana, BA, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Departamento de Ciências Biológicas – UEFS. ³ Centro de Biotecnologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil

⁴ Unidade Experimental Horto Florestal - UEHF, Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, BA, Brasil

This study was carried out to evaluate the antimicrobial activity of extracts of the leaves and leaf waste discarded in the process of obtaining the hard fibers of *Agave sisalana*. The antimicrobial activity was determined by the paper disk diffusion method using Gram-positive and Gram-negative bacteria (non-resistant and resistant to antibiotics) and a fungus. The hydroalcoholic extract obtained from leaves and from sisal waste showed significant inhibition of *Candida albicans*, on the other hand, it was inactive against three strains of *Staphylococcus aureus*, two strains of *Escherichia coli*, a strain of *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella choleraesuis*. The methanol extract of leaves showed weaker reduction in the inhibitory action of *C. albicans* when compared with the above extracts, and it was also inert against the other microorganisms tested.

Keywords *Agave sisalana*; antimicrobial activity; *Candida albicans*

* Corresponding author. E-mail: branco@uefs.br. Fax: +55 75 3224 8010

Introduction

Infections caused by pathogenic microorganisms are responsible for high rates of morbidity and mortality in Brazil (Coelho et al., 2007; Souza et al., 2007). These infections can occur in invasive form, and are an increasing problem due to the increase of their incidence in hospitals, especially in patients who are undergoing cancer treatment, transplantation or are immunosuppressed for other reasons (Oliveira et al, 2001).

The search for new compounds with antimicrobial activity from plants has been the subject of intense research in recent years (Harvey, 2007; Lee, 2007; Hostettmann et al., 2003). This is due mainly to the fact that the plants are widely used in folk medicine to combat various diseases in humans caused by bacteria and fungi (Stefanello et al., 2006; Duarte et al., 2004; Cruz et al., 2007). In this sense, many researchers are aiming to scientifically prove the use of plant extracts as an effective control of infections of the skin (Weckesser et al., 2007), the mouth (More et al., 2008) and other infections caused by a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Vuuren, 2008; Lee et al., 2007; Chauhan et al., 2007).

Agave sisalana Perrine, popularly known as sisal, belonging to the Agavaceae family and is a monocotyledonous plant from Mexico. It is well adapted to the semi-arid region of Northeast Brazil. Brazil is the world's largest producer of *A. sisalana* for the supply of the sisal fiber, and the sisal culture is one of the main economic activities in the semi-arid Bahia State, which accounts for about 90 % of its production (Oashi, 1999). Production sisal is mainly carried out by small farmers and has an important social function, because these producers would find it difficult to

cultivate other crops with satisfactory economic results due to the unfavorable weather conditions in the region (Silva and Beltrão, 1999).

The search for natural products from agro-industrial waste, which may become useful to society, has grown in recent years. Only 5 % of the decortications of the leaves of sisal (*A. sisalana*) produce a hard fiber that is used for various purposes; the remaining 95 % consists of solid waste (mucilage) and waste liquid (juice of the sisal) that are normally discarded by sisal farms (Oashi, 1999). Thus, sisal waste principally contains plant tissue (lignin and cellulose), primary and secondary metabolites, and water, amongst others. In an attempt to utilize this waste, some small local producers have systematically applied this residue to crops in an attempt to obtain improved production, or in the feeding of animals. In this way, researchers have studied this practice and published the use of sisal waste as fertilizer (Lacerda et al., 2006), pesticides (Barreto, 2003) and animal feed (Faria et al., 2008a; Faria et al., 2008b). Pizarro et al. (1999) described the use of sisal waste as being used against larvae of mosquitoes, which transmit tropical diseases.

In this work, we evaluated the antimicrobial activity of *A. sisalana* (leave and sisal waste) in strains that were resistant or non-resistant to antibiotics, which were collected in the Bahia state, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The sisal waste was collected directly using the paraibana-type machine after the decortication process of the leaves of *A. sisalana* in a sisal farm located in the Municipality of Valente, Bahia state, in March 2006. The leaves are also collected in the same local. The sisal residue was subjected to compression and the resultant

liquid was filtered and dried under a controlled temperature (60 °C) to give the crude extract of the sisal residue (ESR). Leaves of *A. sisalana* (approximately 1.3 kg) was crushed in a semi-industrial blender and divided into two portions. These portions were extracted separately by reflux for 12 hours using hydroalcoholic solution (3:7) and methanol to provide the crude hydroalcoholic extract (ESH) and methanol (ESM), respectively.

The microorganisms used in this study were: *Staphylococcus aureus* CCMB 262 (resistant to streptomycin and dihydrostreptomycin), *Staphylococcus aureus* CCMB 263 (resistant to novobicin), *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Escherichia coli* CCMB 261 (sensitive to sulphonamide), *Escherichia coli* CCMB 284, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 264, *Micrococcus luteus* CCMB 283, *Salmonella choleraesuis* CCMB 281, *Bacillus cereus* CCMB 282 and a clinical isolate of *Candida albicans* CCMB 266. Evaluations were made by a diffusion test using 6 mm diameter paper discs impregnated with 5 µL of each sample at a concentration of 1 mg per disc. The tests were performed in triplicate. Positive controls were patterns of inhibition of microbial growth discs impregnated with the antibiotic chloramphenicol (30 mg) and the antifungal, nystatin (10 mg). The bacterial inoculum (100 µL of a suspension containing 10^7 CFU/mL) was uniformly spread using sterile cotton swab on Mueller-Hinton agar poured on Petri dish. The discs loaded with natural products were placed onto the surface of the agar. The same procedure was performed to assess the activity of the yeast, but suspension of this microorganism was standardized to a concentration of approximately 5×10^5 CFU/mL. The plates were incubated at 37 °C for the bacteria and 28 °C for the yeast, for 24 and 48 hours respectively. The results of the study were obtained with the aid of a millimeter ruler,

and the mean and the average standard deviation of the results was calculated. All tests were performed in triplicate.

The MIC for *Candida albicans* CCMB 266 was established by testing its susceptibility by microdilution in broth. The tests were performed in Mueller Hinton broth. The ESR and ESH were resuspended in a solution ultrapure autoclaved water and DMSO (1:1). Then, the resuspended extracts were sterilized by filtration through cellulose acetate membrane (0.22 µm). We prepared serial dilutions of 100 mg/mL to 0.0488 mg/mL of the extracts in sterile microtiter plates of 96 wells. Then, each well received 10 µL of suspension (Scale 3, Mc Farland) of each micro-test. The plates were incubated at 28 °C for 48 hours. We performed a verification of the purity of the suspension of inoculum by a subculture of the volume used in the test (10 µL) in the Mueller Hinton agar plate in a simultaneous incubation. After the period of incubation, were added 50 µL of triphenyl tetrazolium chloride 2-3-5 (VETEC) in the final concentration of 1250 mg/well for qualitative analysis of microbial growth in the wells in order to determine the antimicrobial activity of each dilution of the samples. Controls were performed also tested the viability of microorganisms and the sterility of the culture medium. All tests were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The extract of the sisal residue (ESR) and foliar polar extracts (ESH) and (ESM) of *A. sisalana* were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria (non-resistant and resistant to antibiotics) and a fungus, by the disk diffusion method (Table 1). It was noted that there was a low efficiency of these extracts against the bacteria tested, however, there was significant inhibition of the growth of *Candida*

albicans by the ESR and ESH. This fact can be attested by their halos of inhibition, which were similar to those produced following treatment with nystatin. The MIC for *C. albicans* was evaluated for these extracts by microdilution in broth (Table 2).

The classification of Aligiannis et al. (2001) quantifies the biological activity of natural products based on the results obtained in the MIC test: strong inhibitors up to 0.5 mg/mL, moderate inhibitors function between 0.6 and 1.5 mg/mL and weak inhibitors functions above 1.6 mg/mL). The result obtained by MIC of the extracts ESR and ESH (Table 2) shows effective inhibition of *C. albicans*.

The antimicrobial activity of the extracts of *Agave* species are documented in the literature, however, little is known about the liquid residue of *A. sisalana*, which is discarded during the production of hard fibers. Verástegui et al. (1996), in an evaluation of ethanolic extracts of *A. lechiguilla* against 20 microorganisms (*Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *Candida krusei*, *C. albicans*, *C. rugosa*, *Cryptococcus neoformans*, *C. laurenti*, *C. albidus*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* and *Sporotrix schenckii*), showed action of this plant against the bacteria *C. perfringens* and *S. dysenteriae* and all fungi tested, except against *Candida krusei*. In the other work, Verástegui et al. (2008) examined the biological activity of ethanolic extracts obtained from the leaves of four species of *Agave* (*A. lecheguilla*; *A. picta*, *A. scabra* and *A. lophanta*), and showed that all the extracts tested are active against the fungus *Cryptococcus neoformans*. In addition, the ethanolic extract of *A. picta* also showed activity against *E. coli*.

Yang et al. (2006) tested the antimicrobial activity of 28 compounds isolated from monocotyledonous plants. Among these compounds, ten were saponins with

steroidal nucleus as aglycone with different units of sugars in their structure, and they showed biological activity that is similar to the positive control of amphotericin against *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Specifically, the saponin of *Agave americana* also showed antifungal activity against the pathogenic microorganisms *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*.

Among the antifungal compounds produced by plants, the action of saponins is apparently due to their ability to form complexes with sterols that are present in the membranes of the fungi, which causes the loss of membrane integrity. However, the exact mechanism is not yet fully understood (Osbourne and Morrissey, 1999).

Thus, the hydroethanolic extract obtained of leaves and the foliar sisal residue concentrate of *A. sisalana* demonstrated significant inhibition of *Candida albicans*. The methanolic extract of leaf showed some action against *C. albicans* when compared with the above extracts. Ujikawa and Purchio (1989) isolated and partially characterized some compounds glycosylated from the leaves of *A. sisalana*, which had a pronounced inhibitory effect against the fungus *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Crebrothecium ashbyi*. These results suggest that the bioactive compound (s) of the extract studied here can contain its glycosylated structural unit (principally saponin). At present, this residue is discarded by the sisal farms, but could constitute a potentially useful raw material, which, when stabilized and treated adequately, could be useful in the treatment of diseases caused by *C. albicans*.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Association of Small Farmers in the municipality of Valente -BA (APAEB) for furnishing the sisal waste. The authors also would like to thank the CNPq, and FAPESB for financial support and the CAPES for the scholarship awarded to Jener David G. Santos.

REFERENCES

- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 49:4168–4170.
- Barreto AF (2003). Efeitos do emprego de sucos de agave no tratamento de sementes, controle do ácaro rajado [*Tetranychus urticae* (Koch, 1836)] e fitotoxidade em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch). Dissertation, Federal University of Paraíba, Brazil.
- Chauhan AS, Negi PS, Ramteke RS (2007). Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. Fitoterapia 78:590-592.
- Coelho JCU, Baretta GAP, Okawa L (2007). Seleção e uso de antibioticos em infecções intra-abdominais. Arq. Gastroenterol. 44:85-90.
- Cruz MCS, Santos PO, Barbosa Jr AM et al (2007). Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. J. Ethnopharmacol. 111:409-412.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C (2004). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. Rev. Bras. Farmacogn. 14:06-08.
- Faria MMS, Jaeger SMPL, Oliveira GJC et al (2008a). Composição bromatológica do co-produto do desfibramento do sisal submetido à auto-fermentação. Magistra 20:30-35.

- Faria MMS, Jaeger SMPL, Oliveira GJC et al (2008b). Composição bromatológica do co-produto do desfibramento do sisal tratado com uréia. R. Bras. Zootec. 37:377-382.
- Harvey AL (2007). Natural products as a screening resource. Curr. Opin. Chem. Biol. 11:480-484.
- Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC (2003). Princípios ativos de plantas superiores, EdUFSCar, São Carlos.
- Lacerda MRB, Passos MAA, Rodrigues JJV, Levy P (2006). Características físicas e químicas de substâncias à base de pó de coco e resíduo de sisal para a produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinaefolia* Benth). Rev. Árvore 30:163-170.
- Lee SH, Chang KS, Su MS, Huang YS, Jang HD (2007). Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. Food Control 18:1547-1554.
- More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJM (2008). Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. J. Ethnopharmacol. 119:473-477.
- Oashi MCG (1999). Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba. PhD Thesis, Federal University of Santa Catarina, Brazil.
- Oliveira RDR, Maffei CML, Martinez R (2001). Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev. Assoc. Med. Bras. 47:231-235.
- Osbourne AE, Morrissey JP (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Ver. 63:708–724.

- Pizarro APB, Oliveira Filho AM, Parente JP et al (1999). O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32:23-29.
- Silva ORR, Beltrão NEM (1999). *O Agronegócio do Sisal no Brasil*. Embrapa-CNPA, Campina Grande, Brazil.
- Souza EAF, Almeida LMM, Guilhermetti E, Mota VA, Rossi RM, Svidzinski T (2007). Freqüência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 82:151-156.
- Stefanello MEA, Salvador MJ, Ito IY, Macari PAT (2006). Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16:525-530.
- Ujikawa K, Purchio A (1989). Substâncias antifúngicas, inibidoras de *Aspergillus flavus* e de outras espécies fúngicas, isoladas de *Agave sisalana* (sisal). *Cienc. Cult.* 41:1218-1224.
- Vuuren SF (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119:462-472.
- Verastegui A, Sanches CA, Heredia N, Garcia-Alvarado JS (1996). Antimicrobial activity of extracts of three Chihuahuan desert major plants from the Chihuahuan desert. *J. Ethnopharmacol.* 52:175-177.
- Verastegui A, Verde J, Garcia S et al (2008). Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1249–1252.
- Yang C-R, Zhang Y, Jacob MR, Khan SI, Zhang Y-J, Li X-C (2006). Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1710–1714.

Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B et al (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 14:508-516.

Table 1. Antimicrobial activity of extracts from *Agave sisalana*

Microorganism	Inhibition zone (mm)			
	ESR ¹	ESH	ESM	P ²
Bacteria Gram +				
<i>S. aureus</i> CCMB 285	-	-	-	20
<i>S. aureus</i> CCMB 263 ³	-	-	-	16
<i>S. aureus</i> CCMB 262 ⁴	-	-	-	16
<i>B. cereus</i> CCMB 282	-	-	-	18
<i>M. luteus</i> CCMB 283	-	-	-	20
Bacteria Gram -				
<i>E. coli</i> CCMB 284	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CCMB 261 ⁵	-	-	-	-
<i>P. aureginosa</i> CCMB 264	-	-	-	-
<i>S. cholereasuis</i> CCMB 281	-	-	-	14
Fungi				
<i>C. albicans</i> CCMB 266	18	19	12	20

¹ The extracts were tested in the concentration of 1mg/disc; ² P: bactericidal chloramphenicol (30µg/disc) and fungicidal nystatin (10µg/disc); ³ Resistant to novobicin; ⁴ Resistant to streptomycin and dihydrostreptomycin; ⁵ Sensitive to trimethoprim and resistant to sulfonamide.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (mg/mL) of liquid sisal residue extract (ESR) and hydroethanolic extract of the leaves (ESH) from *Agave sisalana*

Microorganism	ESR	ESH	Nystatin
<i>C. albicans</i> CCMB 266	0.39	0.39	0.00195

CAPÍTULO 2

Obtenção de extratos a partir do resíduo descartado de *Agave sisalana* e avaliação biológica²

² Este capítulo será traduzido para o inglês e encaminhado a periódico especializado.

OBTENÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO RESÍDUO DESCARTADO DE *Agave sisalana* E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

RESUMO:

O Brasil é o maior produtor mundial de fibras de sisal sendo o estado da Bahia responsável por 95 % desta produção. Esta atividade compreende a desfibramento manual das folhas de *Agave sisalana* (*Agavaceae*), resultando em 4 % de fibras duras e em 96 % de resíduos foliares. Neste trabalho descrevemos a obtenção de extratos a partir do resíduo descartado e a avaliação da inibição do fungo *Candida albicans* e da mortalidade do microcrustáceo (citotoxicidade) *Artemia salina*. O resíduo de sisal foi submetido à extração com água destilada (90 °C) /1 hora) e após a filtração foi adicionado solução hidroalcoólica (80 %) permanecendo em repouso por 18 horas. Após esse período, verificou-se a formação de precipitado que foi separado e o sobrenadante submetido à partição com acetato de etila e isobutanol para fornecer os extratos acetato de etila (EAC), butanólico (EBU) e aquoso (EAQ). As análises de RMN ¹H de todos os extratos apresentaram sinais característicos de saponinas espirostanas. A estrutura química das sapogeninas foi analisada por CG-EM após a hidrólise de cada extrato. Neste sentido, verificou-se que *Agave sisalana* bioproduz saponinas esteroidais espirostanas apresentando massa molecular m/z 416 (2 isômeros) e 430 (2 isômeros). A atividade anti-*Candida* de cada substrato foi verificada pela concentração inibitória mínima. O EBU apresentou relevante inibição (0,19 mg/mL) quando comparado com os outros extratos. A avaliação tóxica dos extratos indicou CL₅₀ < 500 ppm nos EAC e EBU. Estes resultados indicam que o resíduo apresenta potencial como fonte de compostos ativos contra *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, resíduo do sisal, *Candida albicans*

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of sisal fibers and the state of Bahia responsible for 95% of this production. This activity includes the manual defibrillation *Agave sisalana* (Agavaceae) sheets resulting in 4% of hard fibers and 96% of waste leaf. In this paper we describe the synthesis of extracts from the residue discarded and the evaluation of inhibition of the fungus *Candida albicans* and mortality of *Artemia salina*. (cytotoxicity). The sisal residue was subjected to extraction with distilled water (90 °C) / 1 hour) and after filtration was added alcohol solution (80 %) and remained at rest for 18 hours. After this period, there was a precipitate which was separated and the supernatant subjected to partition with ethyl acetate and butanol extracts to provide the ethyl acetate (EAC), butanol (EBU) and aqueous (EAQ). Analysis of ¹H NMR of all extracts showed characteristic signs of spirostan saponins. The chemical structure of the sapogenin was analyzed by GC-MS after hydrolysis of each extract. In this sense, it was found that *Agave sisalana* biosynthesis spirostan saponins presenting molecular m / z 416 (2 isomers) and 430 (2 isomers). The anti-*Candida* activity of each substrate was determined by minimum inhibitory concentration. The EBU had relevant inhibition (0.19 mg / mL) when compared with the other extracts. The toxicity of the extracts indicated LC50 <500 ppm in the EAC and EBU. These results indicate that the waste has potential as a source of compounds active against *Candida albicans*.

Keywords: *Agave sisalana*, waste sisal, *Candida albicans*

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas durante séculos como fonte de alimentação, remédio, como modo de comunicação, fins estéticos, religiosos, de proteção (e.g como repelentes), odorizadores, defensivos agrícolas, entre outros (PINTO, 1995). Neste contexto, os produtos fitoterápicos representam um grande mercado mundial. Por exemplo, nos EUA em 2002, correspondeu a mais de um bilhão de dólares (HENDRIKS et al, 2005). Na Europa, o uso da fitoterapia já faz parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em muitas farmacopéias. Exemplos relevantes são os extratos de ginseng e de *Hypericum*, o fitoterápico TMPZ-2 (extrato de *Ligusticum chuanxiong*, utilizado no tratamento da angina), Crataegus bu-wang (anticolesteromêmico) (VIEGAS Jr. et al, 2006).

O gênero *Agave*, família Agavaceae, compreende mais de 480 espécies distribuídas nas regiões áridas e tropicais do mundo, principalmente no México e América Central (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999). Muitas espécies de *Agave* apresentam diversas aplicações comerciais, desde fornecedoras de fibras duras e bebidas alcoólicas, à fonte de matéria-prima esteroideal para indústria de esteróides (DING et al, 1993; PEÑA-ALVAREZ et al, 2004). Este gênero biossintetiza compostos fenólicos, hidrocarbonetos, esteróides, sacarídeos e saponinas. Entretanto, as saponinas apresentam destaque, principalmente pelo significativo número de trabalhos sobre o isolamento e purificação destes compostos nesta família (SIMMONS-BOYCE; TINTO, 2007; CHEN et al, 2009).

Entre estas espécies, *Agave sisalana* Perrine se destaca pelo fornecimento de fibras duras, sendo o Brasil responsável por mais de 50 % da produção mundial de sisal. Em 2008, a produção brasileira destinada à produção de fibras alcançou mais de 234 mil toneladas (IBGE, 2009). O sisal é cultivado em larga escala no Nordeste brasileiro, sendo o estado da Bahia responsável por cerca de 95 %. Neste processo o aproveitamento da planta pela indústria de fibras é de aproximadamente 5 %, sendo o restante descartado na forma de resíduo (SANTOS, 2006). O resíduo do sisal é composto pelos restos de tecido vegetal (lignina e celulose), metabólicos primários e secundários. Dentre os metabólicos secundários, foram descritos compostos fenólicos e esteroides livres (hecogenina e tigogenina) ou conjugados a

unidades de açúcar (saponina) em folhas de *Agave sisalana* (DAWIDAR, FAYEZ, 1961; CHEN et al, 2009; HOSTETTMANN, MARSTON, 1995).

As saponinas são metabólitos secundários encontrados em muitas plantas superiores. São conhecidos pelas suas atividades biológicas, entre elas a antiparasitária, moluscicida, antiinflamatória e fungistática (OAKENFULL; SIDHU, 1989, SANTOS, 2007). No vegetal, estes compostos também estão associadas com o sistema defensivo da planta contra fitopatogénos (OSBOURN; MORRISSEY, 1999).

A investigação de produtos naturais ativos contra *Candida* spp. aumentou significativamente nos últimos 10 anos, com a investigação de cerca de 258 espécies de plantas, de 94 famílias (DUARTE et al, 2005). O atual arsenal antifúngico compreende cinco classes: polienos (interagindo com o ergosterol dos fungos, alterando a membrana citoplasmática), azóis (inibindo 14-lanosterol demetilase na biossíntese do ergosterol), alilaminas (inibição da esqualeno epoxidase na biossíntese do ergosterol), equinocandinas (inibição da síntese de 1,3-glucano, componente necessário da parede celular de muitos fungos), e flucitosina (interagindo com RNA fúngico e inibindo a síntese do DNA) (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; SOBEL, 2007). Os representantes dessas cinco classes são: anfotericina B, fluconazol, terbinafina, caspofungina, e flucitosina, respectivamente. Entretanto, cada droga apresenta algumas deficiências sinalizando a necessidade de descobrir novos agentes antifúngicos, preferencialmente com novos mecanismos de ação.

A candidíase vulvovaginal (CVV) ocupa o segundo lugar entre as vaginites causadas por cepas de *C. albicans* (SOBEL, 2007), sendo um problema comum em mulheres imunocompetentes ou saudáveis. De modo geral, os estudos demonstram através da cultura do fluido vaginal que *Candida albicans* está presente em 84 % dos casos de CVV, seguida de *Candida glabrata* (11,7 %), *Candida tropicalis* (5,3 %), *Candida krusei* (2,6 %) e outras espécies (2 %). No Brasil, foram observadas prevalências de *Candida albicans* em 74 % dos casos, seguida de *Candida glabrata*, em 14,5%; *Candida tropicalis*, em 7,3 %; e *Candida parapsilosis*, em 4,3% (GALLE; GIANINNI, 2004).

Apesar dos avanços na terapia antifúngica, muitos problemas persistem. Fluconazol foi o azol mais utilizado e sua utilização têm resultado na resistência em cepas de *Candida* spp (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009). Em um

trabalho sobre CCV foi observado que todos os isolados de *C. albicans* foram sensíveis a anfotericina B, mas 5,9 % apresentaram sensibilidade dependente da dose ao fluconazol e 2 % de resistência ao itraconazol (GALLE; GIANINNI, 2004).

Recentemente, realizou-se a atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas e do extrato bruto do resíduo de *A. sisalana* contra 10 microorganismos, mostrando relevante atividade anti-*Candida* (SANTOS et al, 2009). Neste trabalho descremos a obtenção de extratos a partir do resíduo de *Agave sisalana* e avaliação da inibição de *Candida albicans* e toxicidade contra *Artemia salina*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos Gerais

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi obtida em equipamento Bruker AC-300 (300 MHz), usando o solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) e tetrametilsilano como solvente e referência interna, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais σ (ppm). As análises por cromatografia gasosa foram obtidos no equipamento CG 2010 (Shimadzu). As análises do produto de hidrólise das frações contendo saponinas foram realizadas por CG, nas seguintes condições: volume de injeção: 1 μ L; período de análise: 20 minutos; Injetor: temperatura: 310 °C Modo: split razão do split: 1/20; gás de arraste: N₂. Modo de controle: velocidade linear. Pressão: 130,6 KPa Fluxo total: 10,8 mL/mim Fluxo na coluna: 0,71mL/mim Velocidade linear : 27,8 cm/segundo. Purga: 3 mL Coluna: Rtx-1 (dimetilpolisiloxano 100 % - 30m X 0,25 mm X 0,25 μ m) Isoterma: 320 °C. As análises no CG-MS foram realizadas nas seguintes condições: volume de injeção: 1 μ L; período de análise: 31 minutos; Injetor: temperatura: 240 °C Modo: split; razão do split: 1/20; gás de arraste: He. Modo de controle: velocidade linear. Pressão: 84,7 KPa Fluxo total: 22,4mL/mim Fluxo na coluna: 0,92 mL/mim Velocidade linear: 36,5 cm/segundo. Purga: 3 mL Coluna: Rtx-5 (5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloxano 30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m) com rampa de temperatura entre 150 a 270 °C estabelecida por 4 minutos, seguido da manutenção em 270 °C por 10 minutos. Logo após foi realizada outra rampa aplicada entre 270 a 300 °C, mantendo a temperatura de 300 °C por 14 minutos. As análises por cromatografia em camada delgada foram

realizadas em placas de sílica F₂₅₄ (Merck), utilizando o sistema de solventes: acetato de etila e hexano (4:5) para sapogeninas e clorofórmio, etanol, água (7:3:1 v/v) para saponinas. Os compostos foram visualizados após o aquecimento (100 °C) revelando com ácido sulfúrico 10%, em etanol.

2.2 Obtenção do resíduo de sisal

O resíduo de sisal foi coletado diretamente na “máquina paraibana” após processo de desfibramento de folhas de sisal, em uma fazenda sisaleira situada no Município de Valente, no estado da Bahia (S 11°24' 53,4”). Neste processo foram utilizadas folhas de sisal após seis com seis anos, coletadas em maio de 2008.

2.3 Preparação dos extratos

A preparação dos extratos foi desenvolvida a partir da metodologia de Pizarro e colaboradores (1999) com algumas adaptações (fluxograma 1). 70 Kg do resíduo do desfibramento do sisal foram extraídos com 70 L de água destilada(1:1), a 90 °C, por uma hora. Após este procedimento, o líquido extrator foi filtrado por duas vezes, utilizando funil com algodão. O líquido extrator foi desidratado em estufa com temperatura controlada (60°C) com rendimento de 8,5 % (6 Kg) de extrato bruto concentrado. Ao extrato bruto desidratado foi adicionada solução hidroalcoólica 80% (1:2 v/v), fornecendo, após 18 horas, um precipitado que foi separado do sobrenadante por filtração.

Ao sobrenadante foi adicionado acetato de etila (1:4 v/v; 3x), resultando na formação de duas fases, permanecendo em repouso por 12 horas. A fase acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador para fornecer o extrato acetato de etila (EAE), com rendimento de 0,51 % (363g). A fase hidroalcoólica foi diluída em água destilada (v/v) e em seguida sofreu partição com *isobutanol* (1:0,3 v/v; 3 x).

Após este período notou-se a formação de cristais que foram caracterizados como manitol, quando analisados por CCD com padrão autêntico.

A fase butanólica (EBU) foi concentrada, em estufa a 50 °C, para fornecer o extrato butanólico com rendimento de 0,035 % (24,7g). A fase aquosa foi concentrada fornecendo o extrato aquoso (EAQ), com rendimento de 1,42 % (1 Kg).

2.4 Análises por RMN de ¹H

Dez miligramas de cada substrato foram diluídos em 0,6 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), separadamente

2.5 Análises por CG

Os extratos EAE, EBU e EAQ foram purificados para obtenção de frações contendo saponinas. A purificação foi realizada em cromatografia em coluna aberta recheada de sílica eluida com gradiente de solventes (acetato de etila e etanol; etanol e metanol; metanol e água, respectivamente). As frações com perfil semelhante foram unidas de acordo com as comparações analisadas em cromatografia de camada delgada. As frações com indicativo para saponinas foram submetidas à permeação em Sephadex LH 20, com metanol, para obtenção de frações contendo saponinas. Uma alíquota das frações contendo as saponinas do extrato acetato de etila, butanólico e aquoso foram submetidos à reação de hidrólise sob refluxo, em solução hidroetanólica 80% (30mL), contendo 5mL de HCl concentrado, por 3 horas. Em seguida, a extração com acetato de etila do produto da reação forneceu as respectivas sapogeninas presentes nas frações, após a retirada do solvente em rotaevaporador. As agliconas foram reservadas e em seguida foram dissolvidas em acetato de etila, na concentração de 0,5mg/mL e analisadas no cromatógrafo a gás e em seguida no cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas.

2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

A determinação da Concentração inibitória Mínima (CIM) para *Candida albicans* CCMB 266 foi estabelecida utilizando o método de SANTOS e colaboradores (2009) Os testes foram realizados em caldo Mueller Hinton. Os substratos EAE, EBU e EAQ foram ressuspensos em uma solução DMSO e água ultrapura autoclavada (1:1). Em seguida, os extratos ressuspensos foram esterilizados por filtração através da membrana de acetato celulose (0,22 mm).

As diluições foram preparadas em série de 100 mg/mL a 0,0488 mg/mL (oito diluições) dos extratos em placas de microtitulação estéreis de 96 poços. Em seguida, cada poço recebeu 10 mL da suspensão (Escala 3 de Mc Farland) do microrganismo-teste em cada poço.

As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. Foi realizada uma verificação da pureza da suspensão de inóculo por meio de uma subcultura da alíquota utilizada no teste (10 µL), em placa de ágar Müeller Hinton para incubação simultânea. Após o tempo de incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, na concentração final de 1,250 mg/poço, para análise qualitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Foram realizados também controles de viabilidade dos microrganismos testados e da esterilidade do meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.7 Avaliação da atividade tóxica

A atividade tóxica dos extratos foi avaliada através do teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach, (MEYER et al, 1982). Ovos de *Artemia salina* foram incubados em água do mar artificial a temperatura ambiente por 48 horas. Com a ajuda de uma fonte de luz, as larvas foram atraídas e coletadas. Soluções dos extratos foram preparadas com água do mar artificial nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm e 1000 ppm. Após esse período adicionou-se 10 larvas recém eclodidas de *Artemia salina*. Os ensaios foram realizados em triplicata. A contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas e esse número foi usado para o cálculo da CL₅₀ pelo método *Probitos*, utilizando o software SPSS. Os extratos com CL₅₀ maiores que 1000 ppm foram considerados inativos. Um teste branco foi realizado, com dez larvas e água do mar artificial.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de extratos

A obtenção de saponinas esteroidais de *Agave* obedece a aplicação de metodologias clássicas, que compreende a retirada das graxas com solventes

orgânicos apolares, e em seguida a extração das saponinas, utilizando solventes polares imiscíveis em água. A utilização de sucessivas técnicas cromatográficas permite assim obter a(s) saponina(s) presentes nos extratos de *Agave* (DING et al, 1989; DING et al, 1993).

Entretanto para *Agave sisalana*, poucos trabalhos relatam à obtenção de extratos contendo saponinas. Pizarro et al (1999) descreve a obtenção de um extrato com saponinas de baixo e de alto peso molecular a partir do resíduo de *A. sisalana* utilizando acetato de etila (1:4 v/v). Nesta etapa foi observado um precipitado, que foi caracterizado como extrato contendo saponinas de alto peso molecular. Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila fornecendo, após 24 horas, outro precipitado caracterizado como extrato contendo saponina de baixo peso molecular. Ujikawa e Purchio (1989) descreveram a obtenção de substâncias antifúngicas a partir do suco das folhas de sisal. O suco de *A. sisalana* foi submetido à repetidas partições com n-butanol e em seguida a este extrato foi adicionado solução de metanol e éter (4:1 v/v), por duas vezes, resultando na obtenção de um precipitado contendo saponinas. Lima e colaboradores (2002) descreveram a obtenção de saponinas de *Cariniana rubra* a partir da extração com acetato de etila seguido do fracionamento em sílica gel. Pistelli e colaboradores (2002) investigando a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos de *Astragalus verrucosus*, verificaram a presença de saponinas no extrato acetato de etila.

A partir destes trabalhos desenvolvemos outra maneira de obter saponinas do resíduo de *A. sisalana*. Neste sentido, espécies de *Agave* contêm uma quantidade significativa de carboidratos, principalmente, oligo e polissacarídeos (LOPEZ et al, 2003). Petit e colaboradores (1995) reportam o uso de solução hidroalcoólica (75 %) para precipitação de gomas para a preparação de extratos ricos em saponinas. Percebemos que a precipitação destas macromoléculas (Figura 1) conduziu para o processo de obtenção de extratos de *A. sisalana* a partir do sobrenadante. A análise por cromatografia de camada delgada (figura 2) demonstrou que todos os extratos contêm saponinas.

3.2 Análise dos constituintes químicos presentes nos extratos

3.2.1 Análises de RMN ¹H

Os espectros de RMN de ¹H dos extratos EAE, EBU e EAQ estão apresentados na figura 3. Pode-se verificar pelo perfil dos sinais que todos os extratos apresentam saponinas. Os sinais entre 0,60 e 3,40 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios de esqueleto esteroidal, enquanto os sinais identificados entre 3,50 e 5,20 ppm podem ser atribuídos presença dos hidrogênios dos açúcares. No EAE foi verificado um sinal intenso em 1,2 ppm característico de hidrocarbonetos. Estes compostos geralmente estão presentes nos extratos apolares da planta.

A comparação entre os espectros de RMN de ¹H (figura 3) permite caracterizar sinais intensos na região de sapogenina em EAE e EBU e discretos no EAQ, podendo indicar baixa quantidade de saponinas neste extrato em relação aos açúcares. Na região de hidrogênio de açúcares verificou-se que EBU e EAQ apresentaram sinais intensos, em comparação com EAE. Esse fato já era esperado pela afinidade desses compostos por solventes polares.

3.2.2 Análises das sapogeninas por CG/CG-EM

A hecogenina (**1**) obtida como padrão para obtenção das condições de análise das agliconas obtidos dos extratos. Neste sentido, observou-se que com a isoterma de 320°C, o tempo de retenção encontrado de **1**, nestas condições, foi de 8,13 minutos. Após esta análise as frações oriundas do EAE, EBU e EAQ foram analisadas por CG para verificar o número e o tipo de sapogeninas presentes nestes extratos. A figura 4 apresenta os respectivos cromatogramas.

Todos os cromatogramas apresentaram pico majoritário em 8,13 minutos. Esse fato indica que todos os extratos apresentam saponinas contendo a aglicona **1**. Entretanto o EBU e EAQ apresentam, além do pico de 8,13 minutos, outros sinais intensos entre 6 - 7 minutos. Esses extratos foram analisados por CG-EM e os fragmentos observados nos espectros de massas estão na tabela 1.

Os picos eluidos entre 6-7 minutos, em todos os cromatogramas, apresentaram o íon molecular de m/z 416 $[M]^+$, e os picos entre 8 – 10 minutos mostraram íon molecular de m/z 430 $[M]^+$. Todos os espectros de massas apresentam o fragmento m/z 139 (figura 5) característico para saponinas espirostanas (DJERASSI, 1970). A diferença de massas (14 daltons) entre os compostos eluidos nestas duas regiões foi atribuída a esteroides não carbonilados e carbonilados em C-12, respectivamente. Em adição, foi verificada em todos os espectros a presença do derivado desidratado da hecogenina (pico **c**). Os picos **a** e **b** foram caracterizados como tigogenina e *neotigogenina* (UEMATSU et al, 2004) e os picos **d** e **e** foram atribuídos a hecogenina e *neohcecogenina*.

3.3 Avaliação biológica dos extratos

3.3.1 Atividade tóxica

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida.

O ensaio de letalidade com *A. salina* revelou que os substratos SAE, SBU e SAQ apresentaram concentração letal de 50% (CL_{50}) de 257,23, 458,90 e 649,17 ppm, respectivamente (tabela 2). Este teste permite avaliar a toxicidade geral e, portanto é considerado um bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al, 2000).

Pizarro et al (1999) ao testar diferentes extratos contendo saponinas de alto e de baixo peso molecular do resíduo do sisal no controle de larvas de mosquito, identificou que na primeira precipitação do extrato bruto com acetato de etila não segregou as “saponinas” com eficiência devido às duas fases apresentarem atividade semelhante, na concentração 405 ppm e 481 pmm, respectivamente. Em seguida foi realizada outra precipitação desta água-mãe. Nesta etapa foi observado que o precipitado apresentou maior letalidade (70%), na concetração de 340 ppm em relação ao sobrenadante. Entretanto a atividade permanece no restante dos extratos com reduzida atividade. Pode-se inferir que os dados da letalidade de *Artemia* são semelhantes aos descritos contra os mosquitos.

3.3.2 Atividade antifúngica

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) para *Candida albicans* CMBB 266 frente aos extratos EAE, EBU e EAQ foram de 50,0, 0,19 e 100 mg/mL, respectivamente (tabela 3). O valor do CIM para o padrão positivo nistatina foi de 0,00195 mg/mL. A análise de RMN ¹H nos extratos mostrou sinais para sapogenina e açúcares, caracterizando a presença de saponinas comuns em *Agave*.

Aligiannis et al. (2001) e Duarte et al (2005) propuseram uma classificação da atividade biológica de produtos vegetais, com base nos resultados CIM como: inibidores fortes - CIM até 0,5 mg/mL; inibidores moderados - CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL; inibidores fracos CIM acima 1,6 mg/mL. O resultado do CIM referente aos SAE, SBU e SAQ revela que os compostos saponínicos presentes no SBU apresentam relevante potencial anti-*Candida*.

Diversos estudos revelaram que saponinas ou extratos ricos em saponinas (ERS) de várias plantas mostraram atividade antifúngica. (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; DUARTE et al, 2005; YANG, 2006). Muitas saponinas apresentam efeito inibitório contra a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (YANG, 2006). Do mesmo modo, saponinas de *Yucca elephantipes*, *Asparagus acutifolius*, *Capsicum annum*, *Phytolacca tetramera*, e *Panax notoginseng* também apresentaram atividade antifúngica (SAUTOUR, TOMOFUMI; LACAILLE-DUBOIS, 2005; ZANG et. al, 2008).

CHAPAGAIN et al (2007) avaliaram a atividade antifúngica de extratos ricos em saponinas das espécies *Balanites aegyptiaca*, *Quillja saponaria* e *Yucca schidigera* frente aos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum coccodes* e *Verticillium dahliae*. A relação da atividade antifúngica com o tipo de saponina majoritária (saponina esteroidais bidesmosídicas, triterpênicas e esteroidais espirostanas, respectivamente) presente em cada extrato pode explicar o modo de ação e os diferentes resultados observados.

4 Considerações finais

Neste trabalho foi possível obter extratos do resíduo de *A. sisalana* descartado pelas fazendas sisalaeiras para a obtenção de fibras. Esses extratos apresentaram rendimentos de 0,51, 0,035 e 1,42 % para o extrato acetato de etila, butanólico e aquoso, respectivamente. O resultado do teste de letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* indica que compostos ativos estão presentes no SAE e SBU devido a CL_{50} abaixo de 500 ppm. Já o SBU apresentou significativa atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM de 190 $\mu\text{g/mL}$), indicando ser um promissor extrato contra infecções causadas por *Candida albicans*.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Associação dos Pequenos Agricultores do Estado da Bahia (APAEB), no Município de Valente-BA, pelo fornecimento do resíduo do sisal, ao Prof. Dr. Jorge Mauricio David, do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, pelas análises de RMN dos extratos. Os autores gostariam também de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e a Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Jener David G. Santos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-GAWAD, M.M; EL-SAYED, M.M; ABDEL-HAMEED, E.S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**.v.70.p371-381, 1999.

ALIGIANNIS N, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.** 49:4168–4170, 2001.

BANDEIRA, D.A. e SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos/Using waste material. In: ANDRADE, Wilson (Org. e Coord.). **O Sisal do Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS, 2006

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química nova**, v. 23(1) p. 20-22, 2000.

CHAPAGAIN, B. P. et al. In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**. v.26. p. 109–115, 2007.

CHEN, P.Y. et al. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**.v. 14, 1789-1795, 2009.

DAWIDAR, A.A: FAYEZ, M.B. Steroid sapogenesis. III. Distribution of steroid saponins in the sisal plant. **Arch Biochem Biophys**. v. 92 p. 420-423, 1961.

DJERASSI, C. Applications of mass spectrometry in the steroid field. **Pure Appl. Chem**. v. 21, n. 2, p. 205-226, 1970.

DING, Y. et al. Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*. **Phytochemistry**. v. 28. p. 2787-2791, 1989.

DING, Y. et al. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. **Chem-Pharm-Bulletin** (Tokyo). v. 41 n.3. p. 557-560,1993.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.97 p. 305 – 311,2005.

GALLE, L. C; GIANINNI,M. J S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40 (4), 2004.

HENDRIKS et al. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**. v.545 (1). P. 53–64, 2005.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**: Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

IBGE, **Censo Agropecuário**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> acesso em 10 de Junho de 2009

LIMA, E et AL. Saponins from *Cariniana rubra* (Lecythidaceae). **Bol. Soc. Chil. Quím.** v.47 (4) pp. 441-447, 2002.

LOPEZ, J. et al. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. **Agric. Food Chem.** v. 51, No. 27, 2003.

MEYER et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**. v. 45.p. 31-34, 1982.

OAKENFULL, D., SIDHU, G.S., 1989. **Toxicants of Plant Origin**, vol. II. CRS Press, Boca Raton, FL.

OSBOURN, A. E; MORRISSEY J. P. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev** 63: 708–724, 1999

PEÑA-ALVAREZ, et al. Characterization of three species by gás chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**. v. 1027.p. 131-136, 2004.

PETIT, P.R. et al. Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. **Steroids**. v. 60. p. 674--680, 1995.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química dos produtos naturais brasileira. **Quim. Nova**,v. 18, 608-615, 1995.

PISTELLI, L. et al. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. **Fitoterapia**. v.73 (4)p. 336-339, 2002.

PIZARRO, A. P.B. et al. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p.23-29, 1999.

SANTOS, J. D. Produção e consumo/Production and consumption. In: ANDRADE, Wilson (Org. e Coord.). **O Sisal do Brasil/ Brazilian Sisal**. Salvador: SINDIFIBRAS, 2006

SANTOS, J.D.G. **Saponinas espirostanas no âmbito farmacêutico**. 2007. 80f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana* . **African Journal of Biotechnology**.v. 8 (22). p. 6181-6184, 2009.

SIMMONS-BOYCE, J. L. & TINTO, W. F. Steroidal Saponins and Sapogenins from the *Agavaceae*. **Natural Product Communications**. v. 2. n.1. p. 99 -114, 2007.

SOBEL, J.D Vulvovaginal candidosis. **Lancet**; 369: 1961–712, 2007.

SOUTOUR, M. C; TOMOFUMI, M; LACAILLE-DUBOIS, M-A. Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity. **Journal natural products** .v. 68(10). p. 1489-1493, 2005.

THOMPSON, G.R.; CADENA, J; PATTERSON, T. F.Overview of antifungal agents. **Clin Chest Med**. v.30. p. 203-215, 2009.

UEMATSU et al. Investigation of spectrophotometrically determined substances in *Yucca* extract by GC/MS and on-column injection GC. **J. food Hyg. Soc. Japan**. v.45(3). 141-145, 2004.

UJIKAWA K, PURCHIO A. Substâncias antifúngicas, inibidoras de *Aspergillus flavus* e de outras espécies fúngicas, isoladas de *Agave sisalana* (sisal). **Cienc. Cult.** v. 41. p. 1218-1224, 1989.

VIEGAS JR et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova.** v. 29 (2). P. 326-337, 2006.

YANG, C. R. *et al.* Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** .50 (5). p. 1710-1714, 2006.

ZANG, Y et al. Steroidal saponins from the stem of *Yucca elephantipes*. **Phytochemistry.** v. 69(1). p. 264-267, 2008.

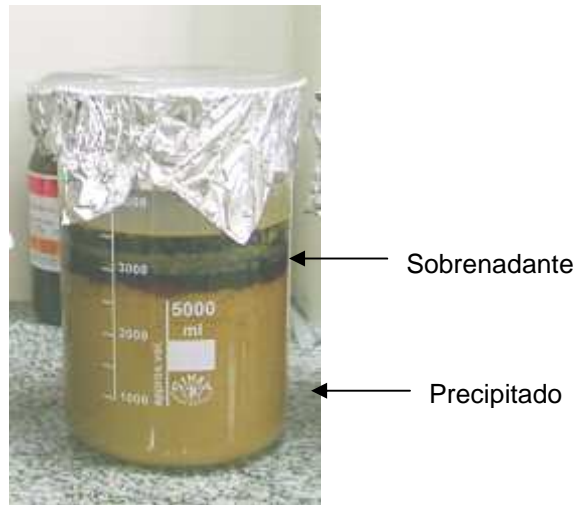


Figura 1. Precipitado formado, após 24 horas, da adição de solução hidroalcolica (80 %) do extrato bruto concentrado do resíduo de *Agave sisalana*.

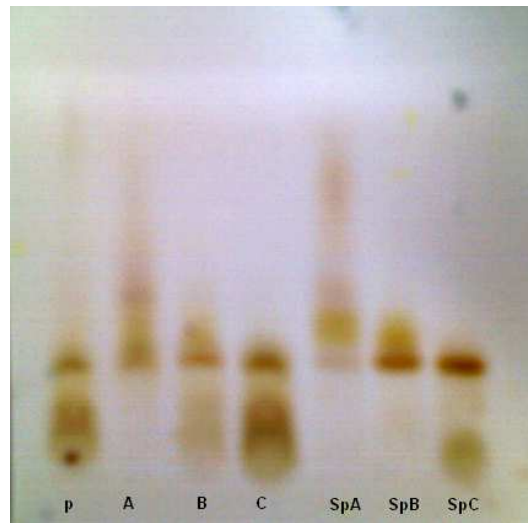


Figura 2. Cromatografia em camada delgada de cada etapa do processo de obtenção dos extratos acetato de etila (A), butanólico (B) e aquoso (C) e as respectivas frações (SpA, B e C) contendo saponinas do resíduo de *Agave sisalana*. (P = precipitado)

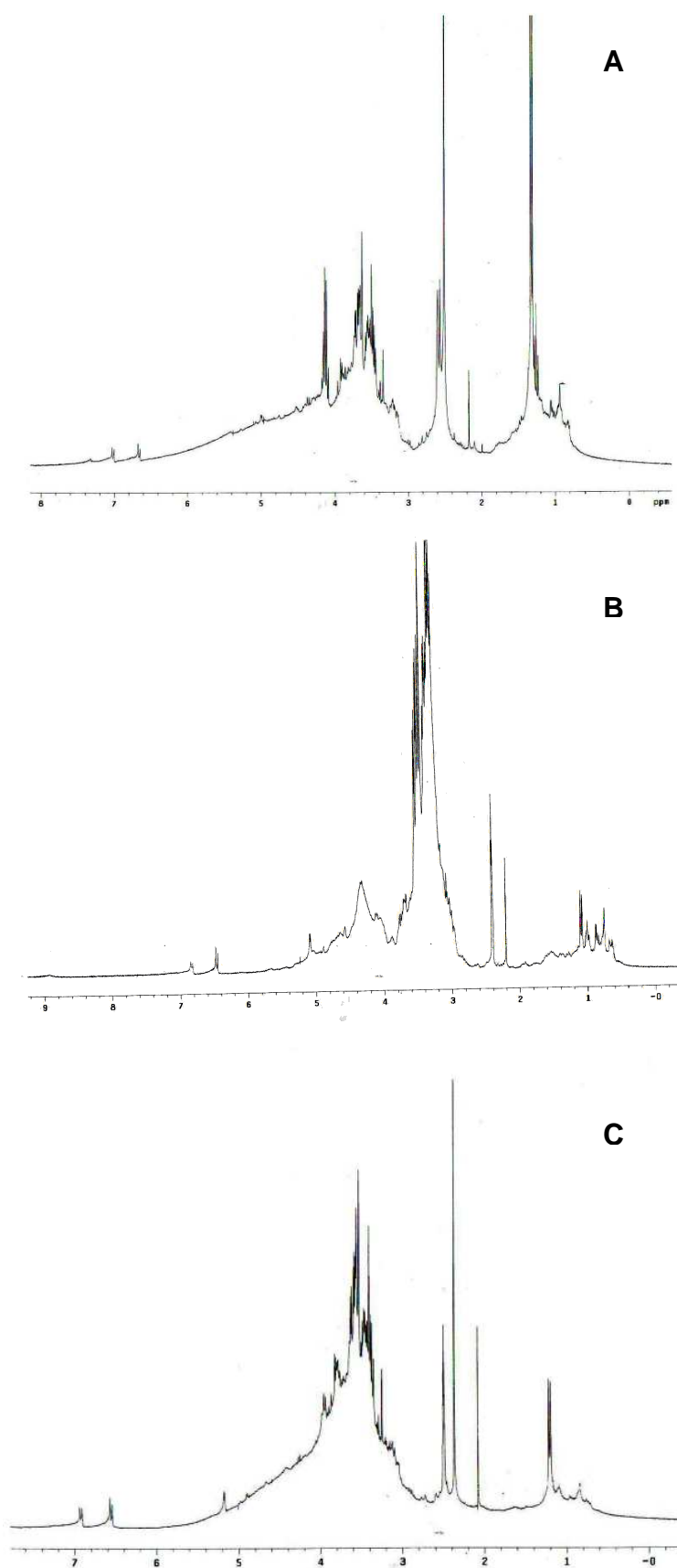


Figura 3: Espectros de RMN ^1H (300 MHz), em $\text{DMSO-}5d$, dos extratos acetato de etila (A), extrato butanólico (B) e extratos aquoso (C) obtido do resíduo de *Agave sisalana*.

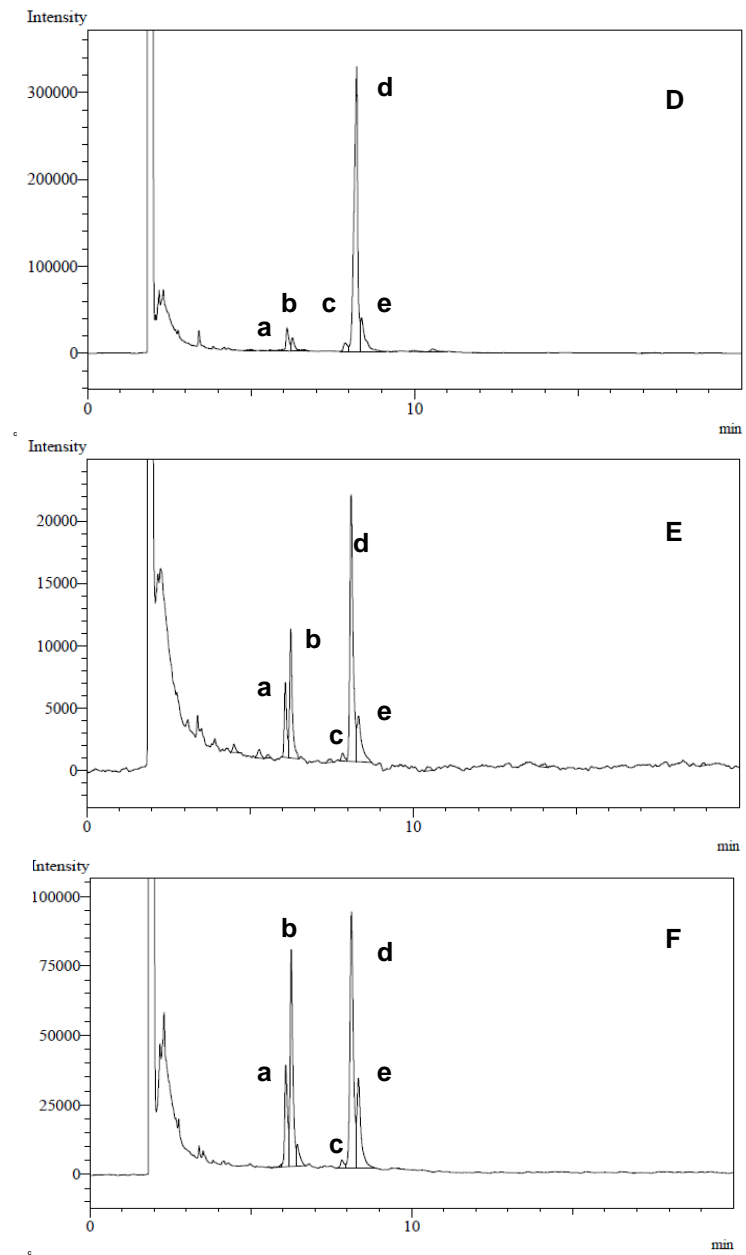


Figura 4: Cromatogramas do produto de hidrólise das frações contendo saponinas oriundas dos extratos acetato de etila (D), substrato butanólico (E) e substratos aquoso (F) do resíduo de *Agave sisalana*

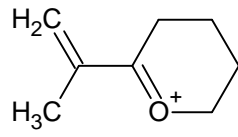


Figura 5. Fragmento ($m/z = 139$) (pico base) de sapogeninas de *Agave sisalana*.

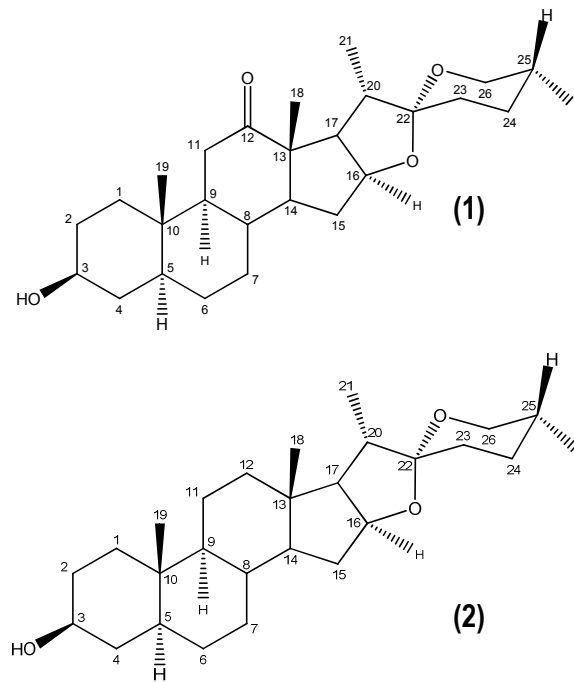


Figura 6. Sapogeninas encontradas em *Agave sisalana*: Hecogenina (1); tigogenina (2).

Tabela 1. Espectros de massas das sapogeninas obtidos por hidrólise a partir do do resíduo de *Agave sisalana*.

Pico	Massa molecular	Pico base	Fragmentos*			
a	416	139	287(14)	273(35)	115(18)	69(36)
b	416	139	287(15)	273(38)	115(18)	69(34)
c	428	139	126(36)	69(25)	-	-
d	430	139	316(9)	273(14)	126(30)	69(26)
e	430	139	316(9)	273(14)	126(30)	69(26)

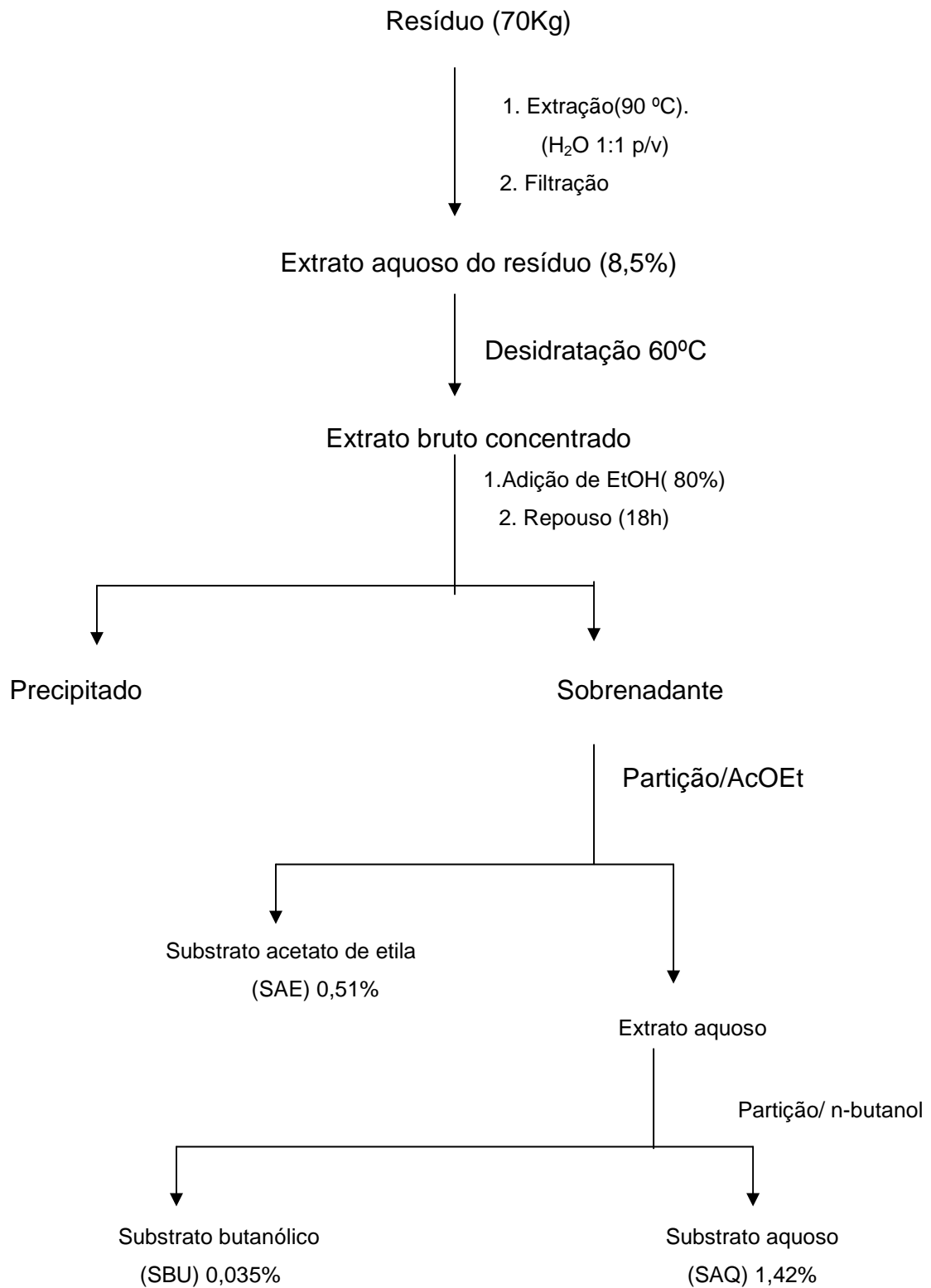
*Intensidade relativa do íon (%) contra o pico base

Tabela 2. Atividade citotóxica dos extratos acetato de etila (EAC), butanólico (EBU) e aquoso (EAQ) a partir do resíduo de *Agave sisalana* utilizando *A. salina*.

<i>Artemia salina</i>	EAC	EBU	EAQ
CL ₅₀ (PPM)	257,23	458,90	649,17

Tabela 3. Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos acetato de etila (EAC), butanólico (EBU) e aquoso (EAQ) a partir do resíduo de *Agave sisalana*

Microorganismo	EAC	EBU	EAQ	Nistatina
<i>C. albicans</i> CCMB 266	50000	190	100000	1,95



Fluxograma 1. Obtenção de extratos a partir do resíduo descartado de sisal.

CAPÍTULO 3

Caracterização parcial de uma saponina esteroidal a partir do resíduo de *Agave sisalana*³

Neste trabalho foi possível obter uma mistura de saponinas necessitando purificá-las para assim proceder a completa elucidação estrutural destes compostos. Assim este capítulo não será enviado para publicação.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA SAPONINA ESTEROIDAL OBTIDA A PARTIR DO RESÍDUO DE *AGAVE SISALANA*

1 INTRODUÇÃO

As saponinas são moléculas naturais de alto peso molecular, formados pela união de triterpenos, esteróides ou glicoalcalóides esteroidais com uma ou mais cadeias de açúcares (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). Entre eles se destacam as saponinas esteroidais, presentes principalmente em vegetais comestíveis e plantas medicinais. Assim, as saponinas esteroidais possuem como aglicona o ciclopentanoperidrofenantreno, apresentando fusão dos anéis b/c e c/d em *trans* e a orientação β das metilas c-18 e c-19, semelhante nos núcleos colestano e androstano (AGRAWAL, 2005). Podem apresentar ciclização da cadeia lateral originando saponinas furostanas, espirostanas e furoespirostanas (SIMMONS-BOYCE; TINTO, 2007; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Nos últimos anos, as saponinas esteroidais têm chamada atenção devido à quantidade significativa de atividades biológicas, tais como: antiparasitária (McALLISTER et al, 2001), moluscicida (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999) antiproliferativa (RAJU; BIRD, 2007) e antifúngica (YANG et al, 2006), entre outras.

O gênero *Agave*, família Agavaceae, compreende mais de 480 espécies distribuídas nas regiões áridas e tropicais do mundo (ABDEL-GAWAD; EL-SAYED; ABDEL-HAMEED, 1999). Entre estas espécies, DESTACA-SE *Agave sisalana* Perrine QUE é utilizada como fonte de fibras duras, sendo o Brasil responsável por mais de 50 % da produção mundial de sisal. Neste processo o aproveitamento da planta pela indústria de fibras é de aproximadamente 5 %, sendo o restante descartado na forma de resíduo. A literatura relata a presença de saponinas esteroidais no sisal (DING et al, 1989; DING et al, 1993).

Neste trabalho descrevemos a análise de saponinas do extrato acetato de etila obtido partir do resíduo descartado de *A. sisalana* utilizando RMN como ferramenta para caracterização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro ABB FTLA 2000-100 utilizando pastilhas de KBr. As análises de RMN de ^1H e ^{13}C , COSY ^1H - ^1H , HMQC, HMBC foram obtidos em Bruker AC-500 (500 MHz), em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), o tetrametilsilano foi utilizado como referência interna para todas as análises e os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais σ (ppm). A cromatografia de camada delgada foi realizada em placas de sílica F₂₅₄ (Merck), utilizando o sistema de solventes: acetato de etila e hexano (4:5) para saponinas e clorofórmio, metanol, água (7:3: 1v/v) para saponinas. Os compostos foram visualizados por aquecimento (100°C) usando ácido sulfúrico 10%, em etanol. Os espectros de massas foram obtidos em LCMS-IT-TOF (Shimadzu) com ionização por *electrospray*.

2.2 Material vegetal

O resíduo da folhas de *Agave sisalana* foi coletado diretamente na máquina “tipo paraibana” após processo de desfibrilação de folhas de sisal, em uma fazenda sisaleira situada no Município de Valente, estado da Bahia (S 11°24' 53,4"). Neste processo foram utilizadas folhas de sisal com seis anos de idade, coletadas em maio de 2008.

2.3 Extração e isolamento

A metodologia de extração de saponinas está descrita no capítulo 2 (pagina 66). Uma alíquota do extrato acetato de etila (EAE) foi submetida à cromatografia em coluna de vidro recheada com sílica gel, eluída com gradiente de solventes (acetato de etila a água) resultando em 28 frações. Após análise em cromatografia em camada delgada, as frações 7-9 foram unidas (14g) e em seguida fracionada por cromatografia em permeação em gel, em coluna de vidro de 8 cm x 3 cm (di), empacotada com Sephadex LH 20 eluída com metanol obtendo uma mistura de saponinas do extrato acetato de etila (MSEAE).

A partir da MSEAE (23 mg) foi realizada a reação de hidrólise sob refluxo, em solução hidroetanólica 80% (30mL), contendo 5mL de HCl concentrado, por 3 horas. Em seguida, a extração com acetato de etila do produto da reação forneceu as respectivas saponinas presentes na MSEAE, após a retirada do solvente em rotaevaporador.

Uma alíquota da MSEAE (20 mg) foi submetida à reação de acetilação utilizando anidrido acético (4,6 mL), piridina (2,3 mL) e DMAP (4-dimetilalilpiridina) (quantidades catalíticas) sob agitação durante 48h. A reação de esterificação foi comprovada quando o produto da reação foi fracionado em coluna recheada com sílica gel. As frações que apresentavam o mesmo perfil, através do monitoramento em camada delgada, foram reunidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de saponinas em folhas do sisal e no resíduo é descrita na literatura (DING et al,1989, DING et al, 1993). A metodologia clássica de obtenção destes compostos compreende a retirada das graxas, o uso de solventes imiscíveis em água (butanol) seguida de sucessivas técnicas cromatográficas. Entretanto, não existem relatos de obtenção de saponinas em espécies de *Agave* spp. utilizando acetato de etila. Por outro lado, Ujikawa e Purchio (1989) descreveram a obtenção de substâncias antifúngicas a partir do suco das folhas de sisal.

Pizarro et al (1999) descreveram a obtenção de um extrato contendo saponinas “de baixo” e “de alto peso molecular” a partir do resíduo de *A. sisalana* utilizando acetato de etila (1:4 v/v) no entanto não apresentaram a identificação destas saponinas. A partir destes trabalhos desenvolvemos outra maneira de obter uma mistura de saponinas do resíduo de *A. sisalana* a partir do extrato acetato de etila.

Neste trabalho, submetemos o extrato bruto concentrado do resíduo de *A. sisalana* à extração por partição com acetato de etila. A fase acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador para obtenção do extrato concentrado (EAE) seguido do fracionamento, por cromatografia em coluna aberta recheada de sílica. Após análise em cromatografia em camada delgada, as frações 7-9 foram unidas (14g) e submetidas a sucessivos fracionamentos utilizando permeação em Sephadex LH 20 para obter a MSEAE, que se apresentou com aspecto de pó bege, semelhante à

sisalanina complexa obtida por Ujikawa e Purchio (1989). A presença de saponinas esteroidais foi verificada através da hidrólise ácida seguida da extração com solvente apolar. A aglicona majoritária observada foi a hecogenina, quando comparada com os padrões, em camada delgada. Na fase polar foi observada a presença dos açúcares glicose, xilose e ramnose. Entretanto o tipo de ligação (α e β) e sítio de ligação entre eles não foi completamente elucidado.

A MSEAE foi caracterizada a partir da análise dos dados espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C , COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, HMQC, HMBC) e por comparação com os dados disponíveis na literatura (DING *et al*, 1989; DING *et al*, 1993; ABDEL-KALINK *et al*, 2002; ZOU *et al*, 2006; MIMAKI ; YOKOSUKA, 2007).

O espectro de IV apresentou o sinal 3419 cm^{-1} referente ao estiramento de OH, caracterizando a presença de substâncias glicosiladas. O sinal referente ao estiramento 1704 cm^{-1} , caracteriza a presença de carbonila na estrutura e a absorção em 919 e 896 cm^{-1} sinaliza a configuração do C-25 da aglicona (figura 23). O espectro de IV da MSEAE acetilada (figura 24) quando comparado com o composto natural revelou a redução do sinal 3419 cm^{-1} , indicando que houve acetilação do composto natural. A MSEAE analisada em espectro de RMN ^1H , revelou a presença de dois singletos em δ_{H} 1,07 e em 0,64 (Tabela 1) atribuídos a grupamentos metínicos (Me) angulares. A presença de dubletos em δ_{H} 1,34 ($J = 7,0$ Hz) e em 0,68 ($J = 6,0$ Hz) foi atribuída aos grupos metínicos secundários (figura 3), caracterizando o esqueleto esteroidal. Adicionalmente, dois dubletos em δ_{H} 4,38 ($J = 6,9$ Hz) e 4,38 ($J = 5,4$ Hz) (figuras 5 e 6) foram observados caracterizando a presença de hidrogênios ligados a carbono anomérico.

O sinal espectrométrico de RMN ^{13}C em δ_{C} 109,27 na MSEAE indica a presença do acetal característico do anel espiro, presente em saponinas espirostanas (Tabela 1 e figura 11). Os sinais observados entre δ_{C} 10 e 60 (figuras 8 e 9) sugerem a presença de estrutura esteroidal. Os sinais entre δ_{C} 60 e 80 (figuras 9 e 10) podem ser relacionados aos carbonos ligados a OH, dos açúcares e ligação covalente entre carbono e oxigênio da aglicona, quando comparados com um composto de referência (tabela1).

Os sinais entre δ_c 100 e 106 (figura 11) podem ser caracterizados como de carbonos hemiacetálicos (anoméricos) referente às unidades de açúcar presentes em saponinas. O sinal em δ_c 212,76 (figura 12) pode sugerir a presença de carbonila na estrutura. Os dados espectrométricos descritos anteriormente permitem sugerir que a aglicona majoritária na MSEAE é a hecogenina.

As atribuições dos dados de RMN para a MSEAE foram realizadas também pela análise dos mapas de contorno de HSQC e HMBC. De fato, o experimento de HSQC mostrou a correlação de hidrogênios confirmando a presença do núcleo esteroidal. O experimento de correlação à longa distância (HMBC) revelou acoplamento entre: C-3 (δ_c 75,24) e H-2 (δ_H 1,55 $^2J_{CH}$), H-4 (δ_H 1,76 $^2J_{CH}$) e H-1 (δ_H 0,70 $^3J_{CH}$); C-18 (δ_c 75,24) e H-17 (δ_H 2,75 $^3J_{CH}$) e H-14 (δ_H 1,35 $^3J_{CH}$); C-22 (δ_c 109,21) e H-20 (δ_H 1,90 $^2J_{CH}$), H-23 (δ_H 1,55 $^2J_{CH}$), H-21 (δ_H 1,34 $^3J_{CH}$), H-25 (δ_H 1,54 $^3J_{CH}$) e H-26 (δ_H 3,48) $^3J_{CH}$) (figuras 19, 20 e 21) permitindo confirmar a presença da aglicona hecogenina. Outras correlações estão descritas na tabela 1.

As análises por ESI-MS (figura 22) mostraram a presença de sinais com massa acima de 1000 Daltons, sugerindo a presença de saponinas com mais de duas unidades de açúcar. Entretanto não foi possível identificar quais açúcares estão ligados a hecogenina.

REFERÊNCIAS

ABDEL-GAWAD, M.M.; EL-SAYED, M.M; ABDEL-HAMEED, E.S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**.v.70.p371-381, 1999.

DING, Y. *et al.* Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*. **Phytochemistry**. v. 28. p. 2787-2791, 1989.

DING, Y. *et al.* Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. **Chem-Pharm-Bulletin** (Tokyo). v. 41 n.3. p. 557-560,1993.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**: Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

McALLISTER, T. A. *et al.* Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. **Vet Parasit**. v. 97. p. 85–99, 2001.

MIMAKI, Y YOKOSUKA, A. Steroidal Glycosides from *Agave utahensis*. **Chem. Pharm. Bull.** V. 55(1) p. 145—149, 2007

PIZARRO, A. P.B. *et al.* O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p.23-29, 1999.

RAJU, J.; BIRD, R. P. Diosgenin, a naturally occurring spirostan saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. **Cancer Letters**. v. 255 (2). p. 194-204, 2007.

WU, G. *et al.* Steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**. v. 42 (6), p. 1677-1681, 1996.

YANG, C. R. *et al.* Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**.v.50(5).p.1710-1714, 2006.

ZOU, P *et al* The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves. **Magnetic Resonance in Chemistry**.44: 12 1090-1095, 2006.

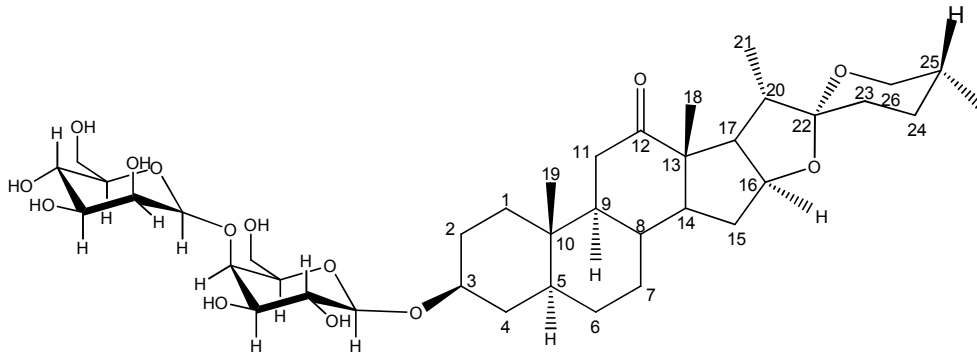


Figura 1: Saponina modelo **Mo-1**.
Fonte: (WU et al,1996)

Tabela 1: Dados espectrais de RMN ^{13}C e RMN ^1H da aglicona da MSEAE em piridina- d_5 , δ em ppm, (J , em Hz)

	HMQC		HMBC		Mo-1 = C ₅ D ₅ N, [1]	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
10	36.13	-	3H-19	H-6; H-11 ^a	36.21	-
12	212.76	-	2H-11	H-17; 3H-18	210.80	-
13	55.23	-	H-16; H-17; H-20; 3H-18	2H-11	55.30	-
22	109.21	-	H-20; H-23	3H-21; H-25; H026a	109.27	-
CH						
3	75.24	3.83	H-2b; H-4b	H-1a	76.78	3.84
5	44.30	0.84		3H-19	44.31	0.80
8	34.18	1.73		H-11b	34.54	1.60
9	55.38	0.89		3H-19	55.43	0.85
14	55.77	1.35		3H-18	55.48	
16	79.57	4.58	2H-15; H-17		79.64	4.45
17	54.14	2.75 (t, 8.5)	H-20	H-15a; 3H-18; 3H-21	54.23	2.75
20	42.49	1.90	H-17; 3H-21		42.58	1.86
25	30.40	1.54	2H-26; 3H-27		29.95	1.55
CH₂						
1	36.47	1.35, 0.70			36.55	1.25, 0.70
2	29.08	1.55, 1.40			29.69	1.45
4	34.47	1.76, 1.32			34.26	1.76, 1.25
6	28.44	1.10			28.53	1.10
7	31.66	1.69, 1.64			31.73	1.35
11	37.86	2.35 (t, 14.5), 2.22 (dd, 14.5, 5.0)			37.97	2.35, 2.20
15	31.31	2.10, 1.58			31.64	2.06, 1.50
23	31.57	1.55		H-20	31.73	1.65
24	29.31	1.98		2H-26; 3H-27	29.16	1.95
26	66.81	3.58 (dd, 10.5,), 3.48 (t, 105)		3H-27	66.89	3.55, 3.45
CH₃						
18	15.97	1.07 (s)		H-14; H-17	16.04	1.05 (s)
19	11.58	0.64 (s)			11.50	0.62 (s)
21	13.79	1.34 (d, 7.0)	H-20	H-17	13.89	1.34 (d, 6.9)
27	17.18	0.68 (d, 6.0)			17.26	0.65 (d, 6.8)

Dados espectrais da mistura de saponinas do extrato acetato de etila (MSEAE)⁴

⁴ As figuras a seguir consistem nos espectros e suas respectivas ampliações da MSEAE obtidas a partir do resíduo de *Agave sisalana*.

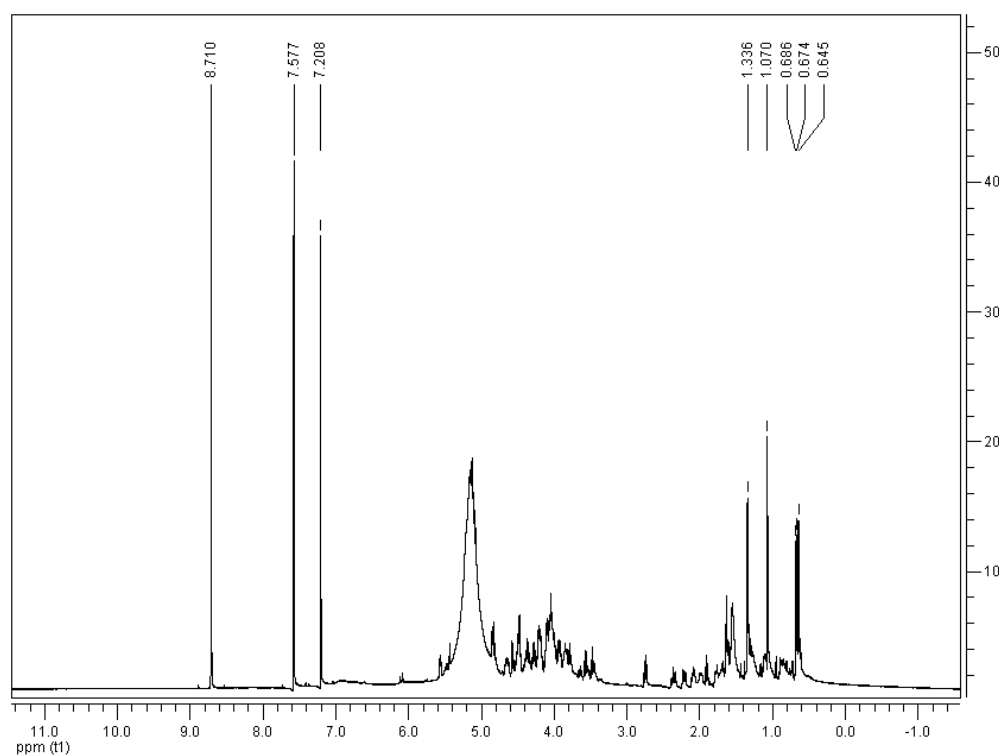


Figura 2: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da MSEAE, em piridina- d_5 , δ em ppm, (J , em Hz)

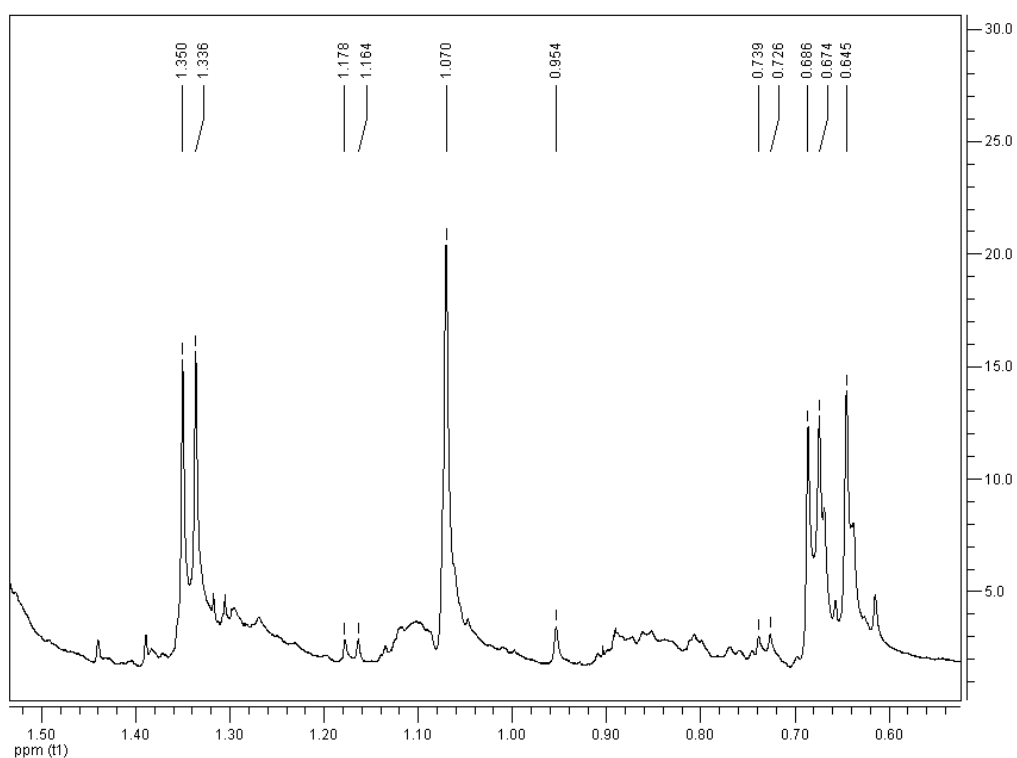


Figura 3: Ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz) da MSEAE em piridina- d_5 , δ em ppm, (J , em Hz)

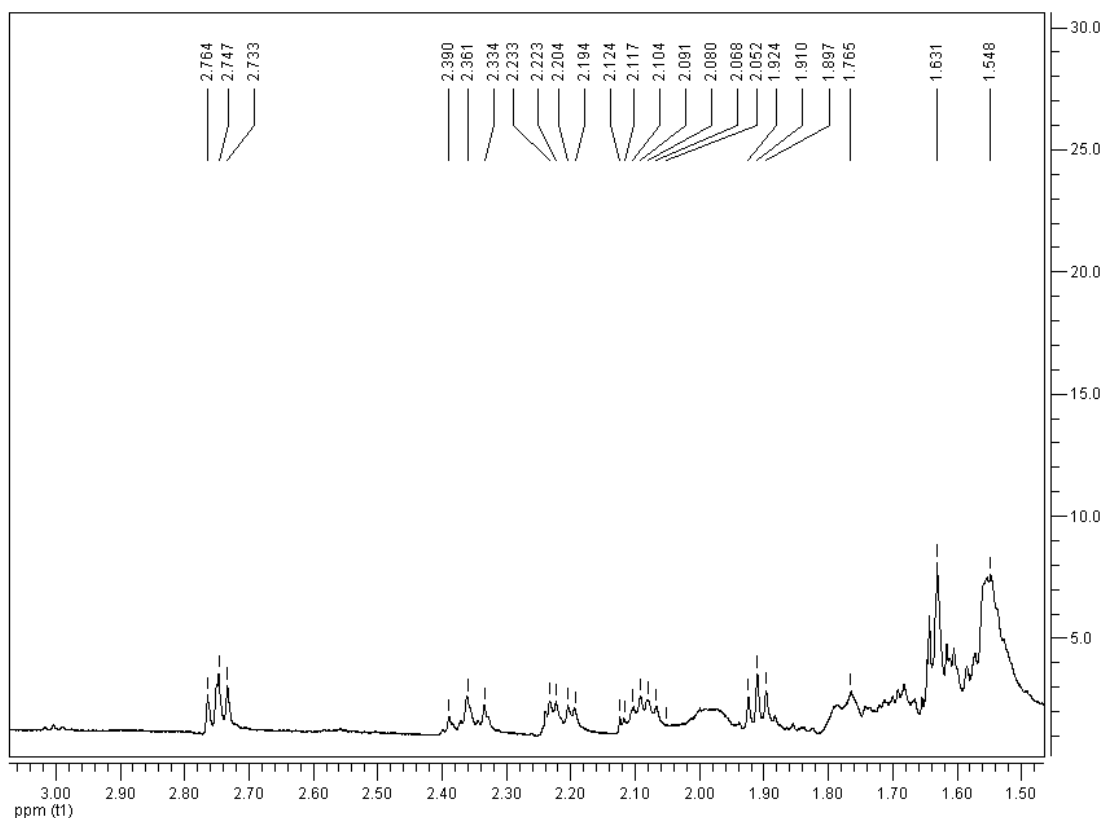


Figura 4: Ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz) da MSEAE entre δ 1,5 e 3 ppm em piridina- d_5 ,

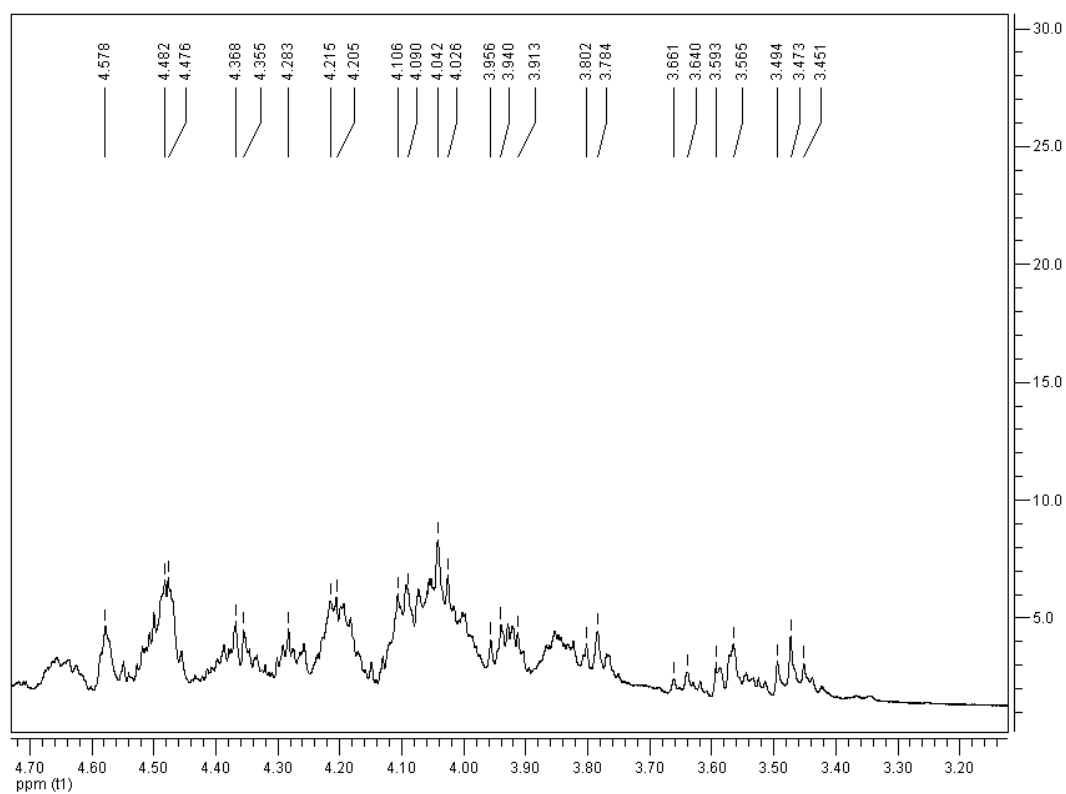


Figura 5: Ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz) ^1H RMN da MSEAE entre δ 3,2 e 4,7ppm em piridina- d_5 ,

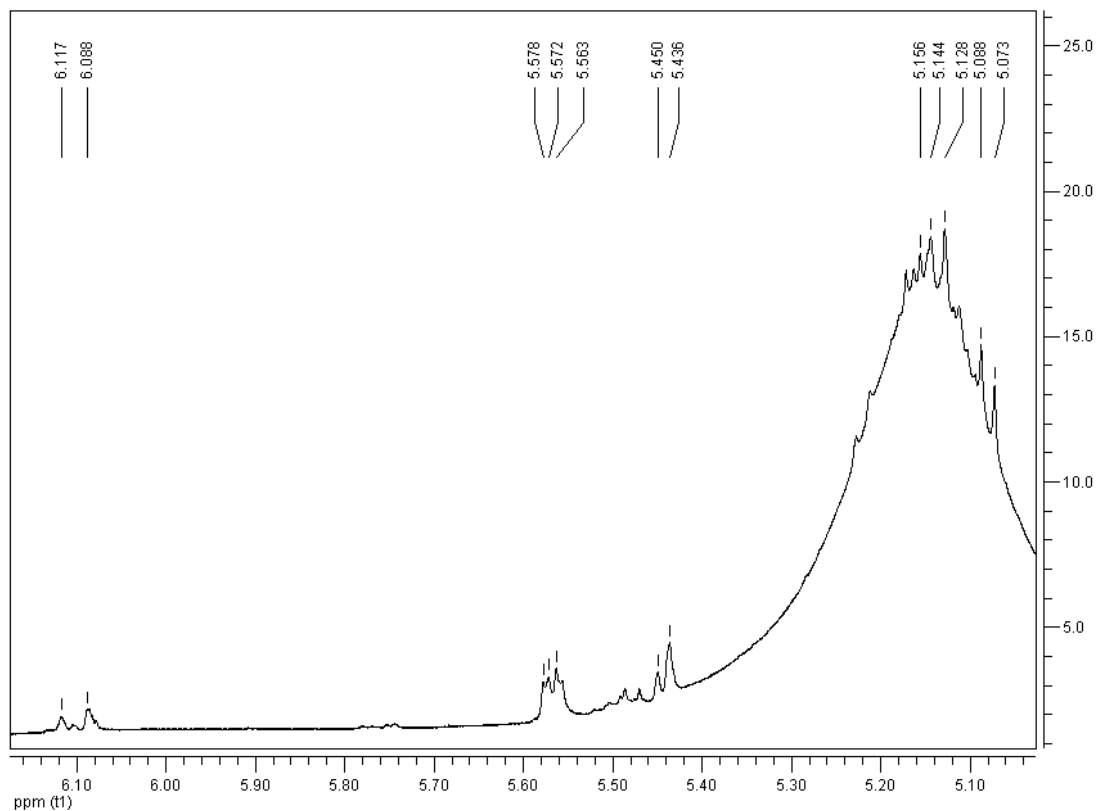


Figura 6: Ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz) da MSEAE entre δ 1,5 e 4 ppm em piridina- d_5 ,

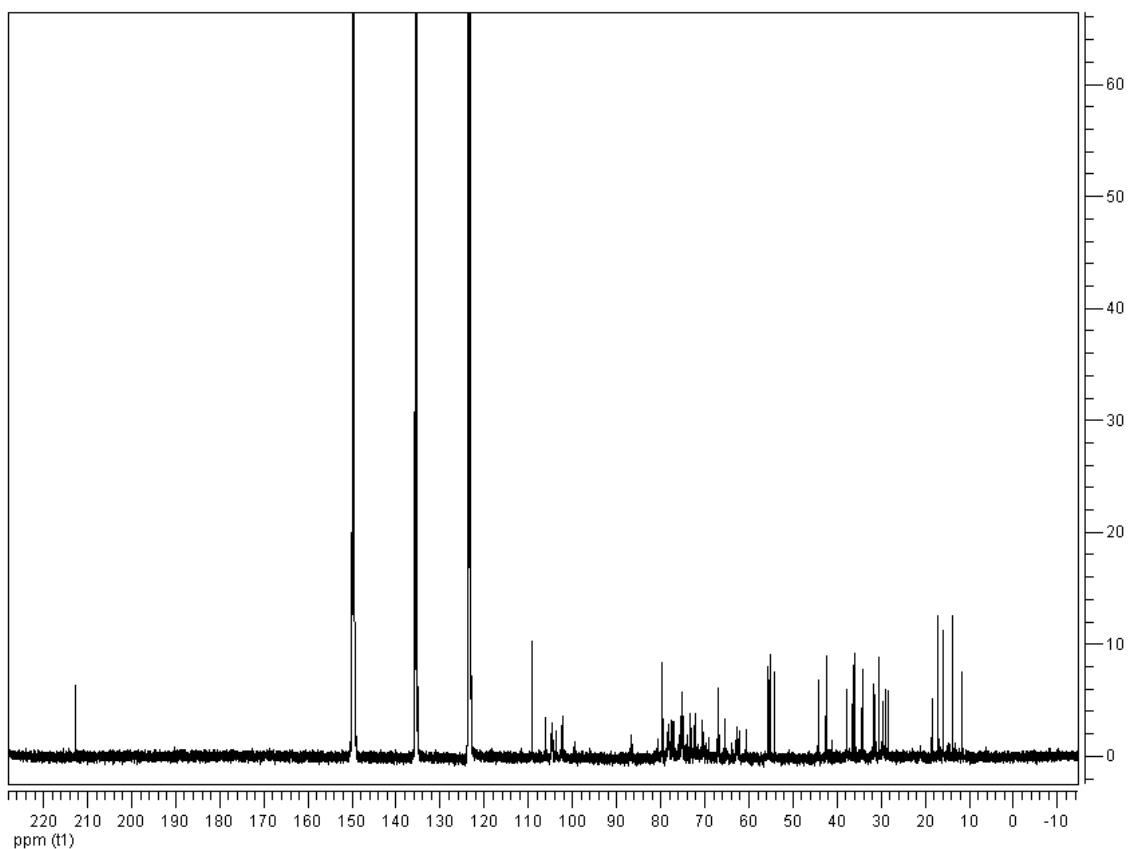


Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz) da MSEAE piridina- d_5 , δ em ppm, (J , em Hz)

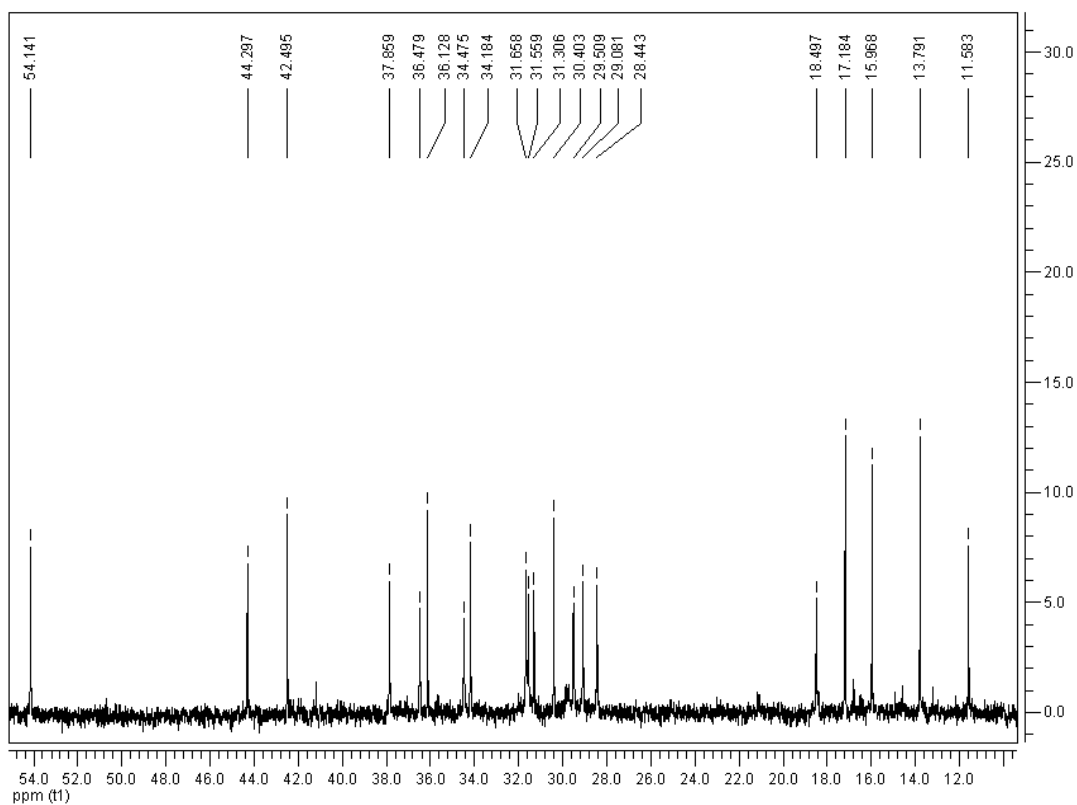


Figura 8: Ampliação de espectro RMN ^{13}C (500 MHz) da MSEAE entre δ 11 e 54ppm em piridina- d_5 .

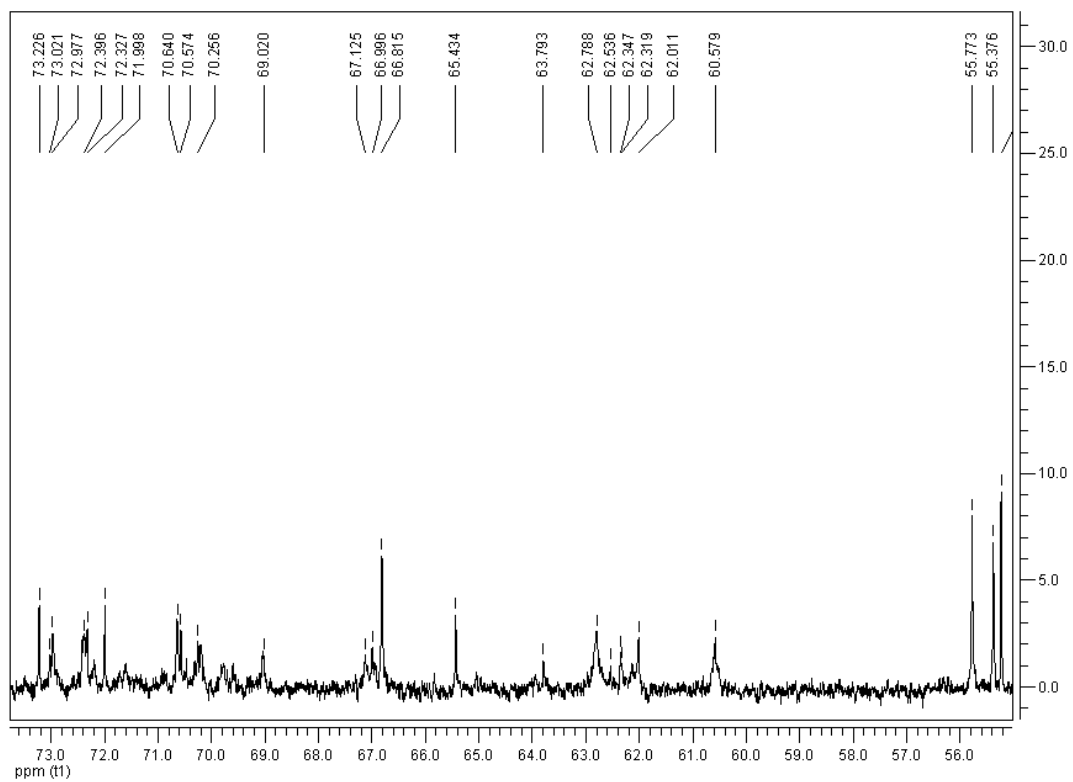


Figura 9: Ampliação de espectro RMN ^{13}C (500 MHz) da MSEAE entre δ 54 e 73 ppm em piridina- d_5 .

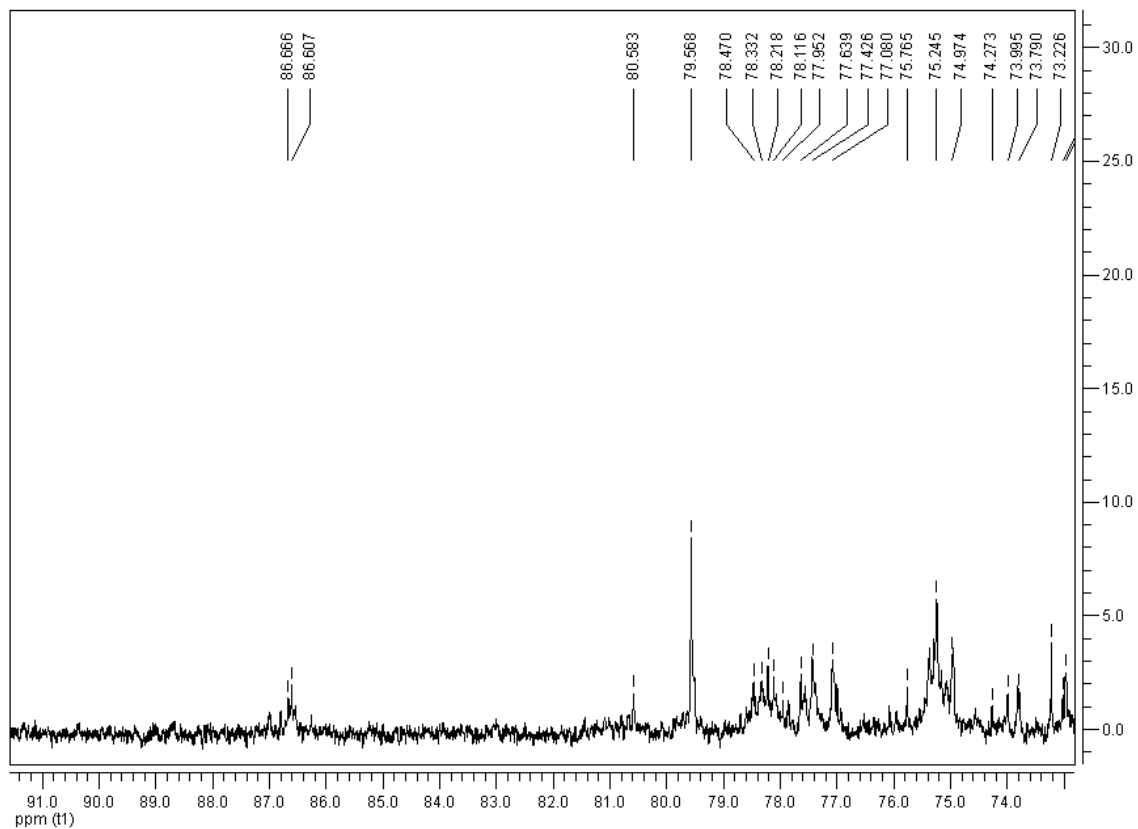


Figura 10: Ampliação de espectro RMN ^{13}C (500 MHz) da MSEAE entre δ 73 e 91 ppm em piridina- d_5 .

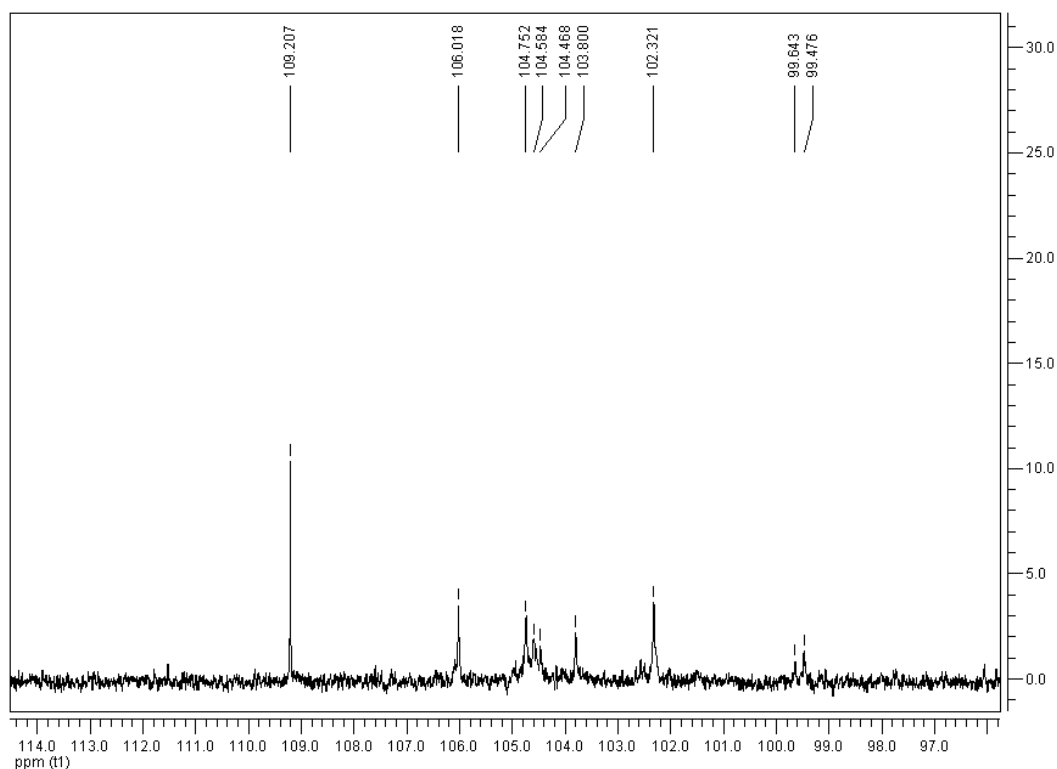


Figura 11: Ampliação de espectro RMN ^{13}C (500 MHz) da MSEAE entre δ 96 e 114 ppm, em piridina- d_5 .

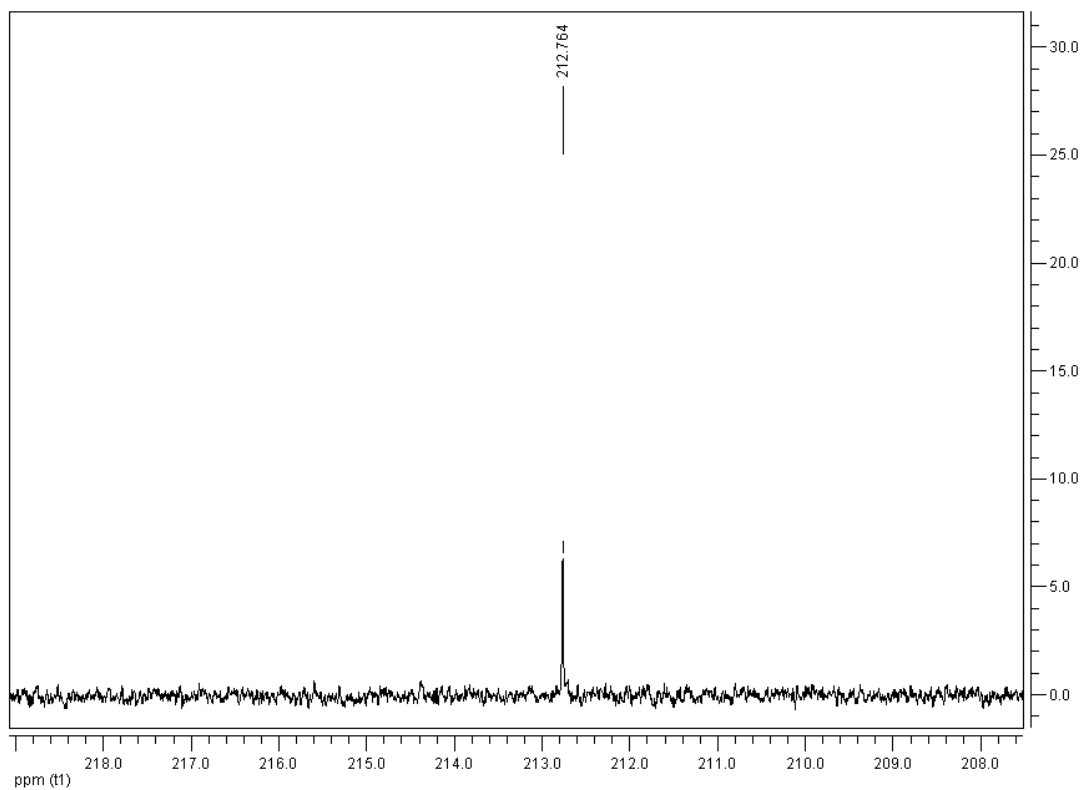


Figura 12: Ampliação de espectro ^{13}C RMN (500 MHz) da MSEAE entre δ 208 e 118ppm, em piridina- d_5 .

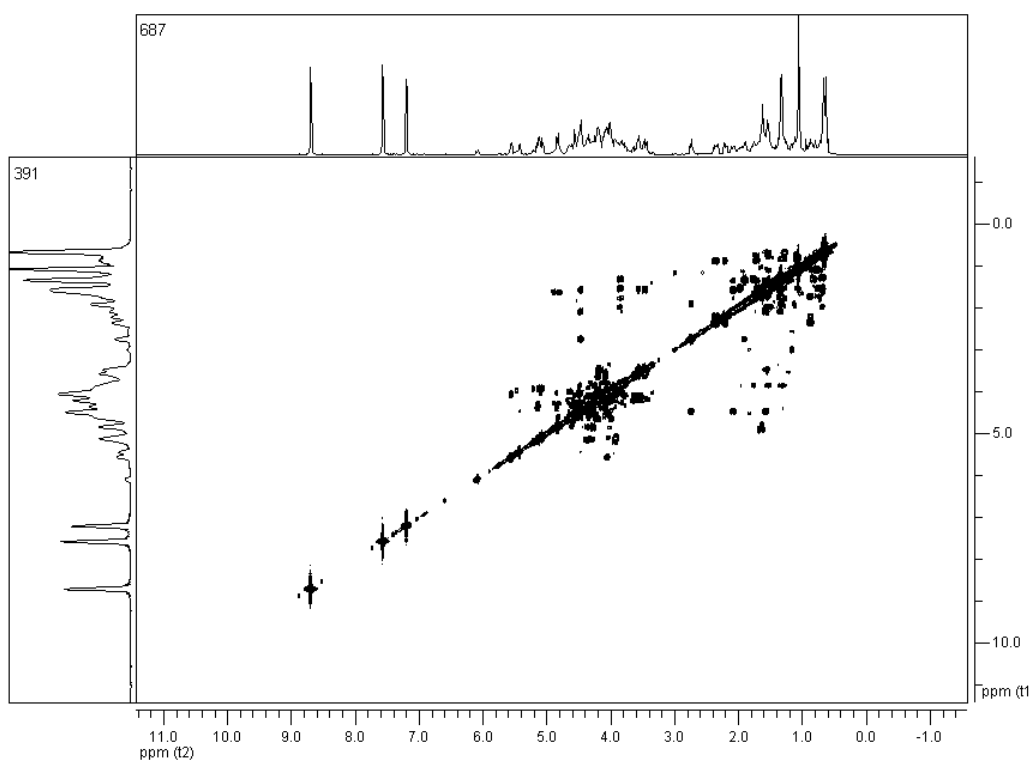


Figura 13: Correlação espectroscópica homonuclear (^1H - ^1H COSY) da MSEAE, em piridina- d_5 .

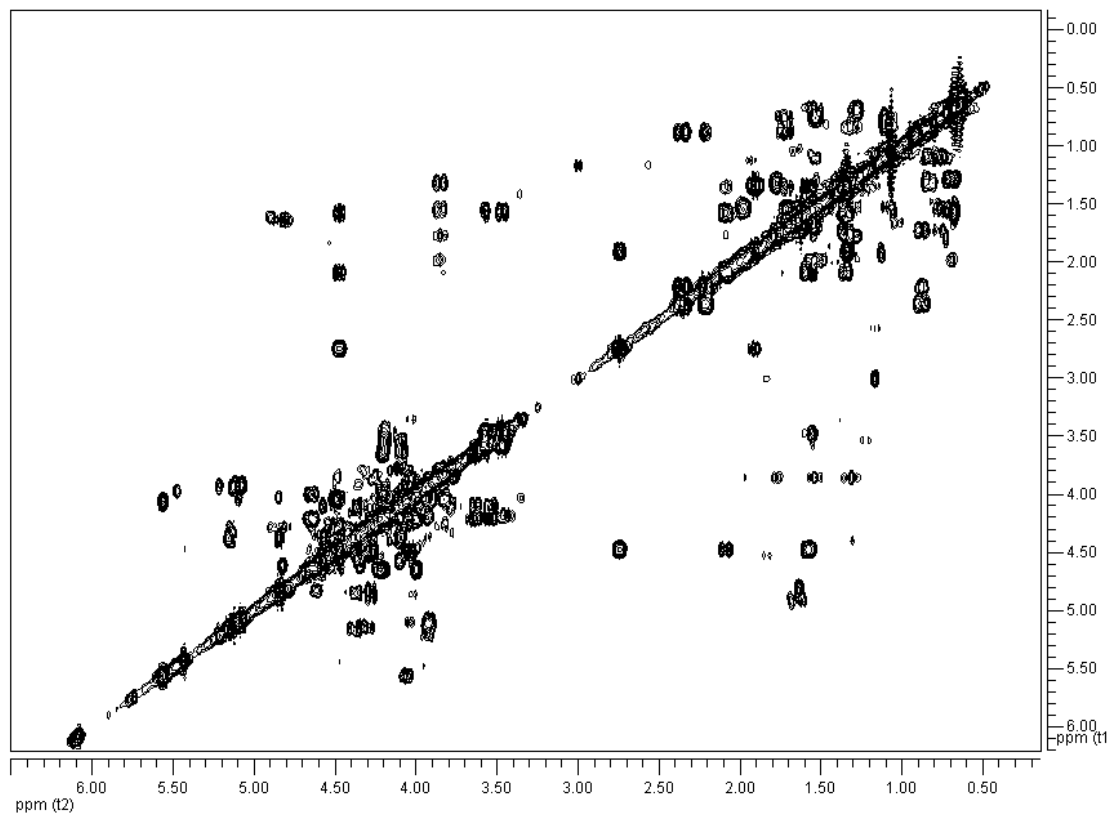


Figura 14: Ampliação da correlação espectroscópica homonuclear (¹H - ¹H COSY) da MSEAE, em piridina-*d*₅.

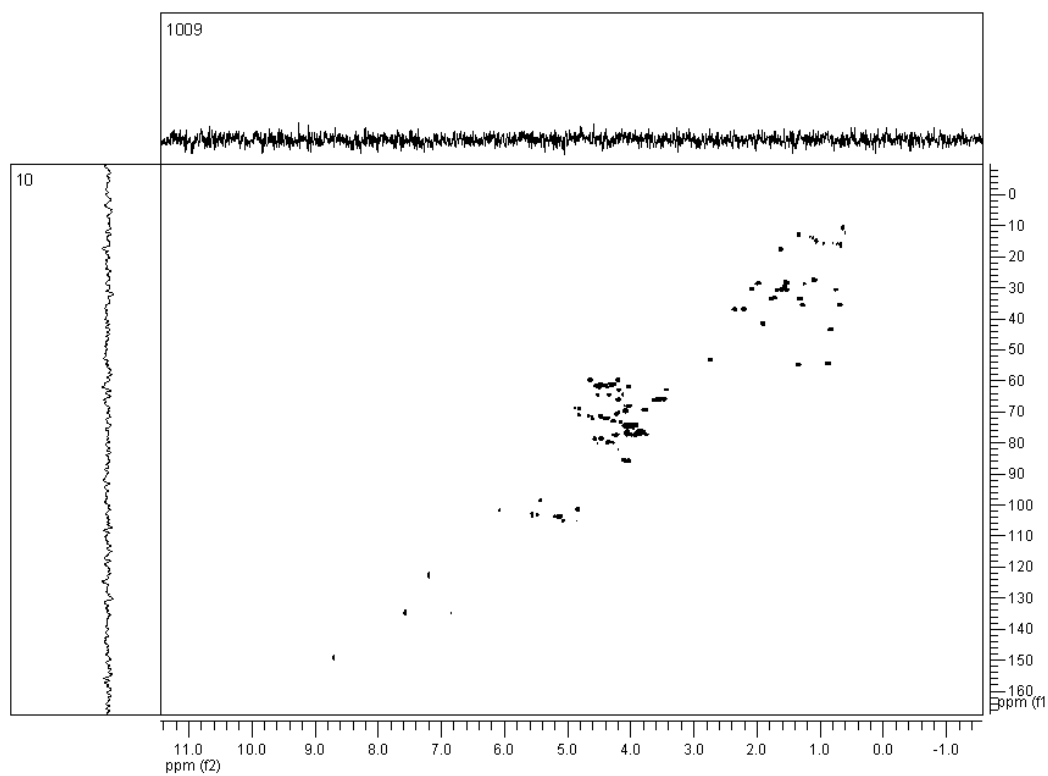


Figura 15: Correlação heteronuclear múltiplo quântica (HMQC) da MSEAE, em piridina-*d*₅.

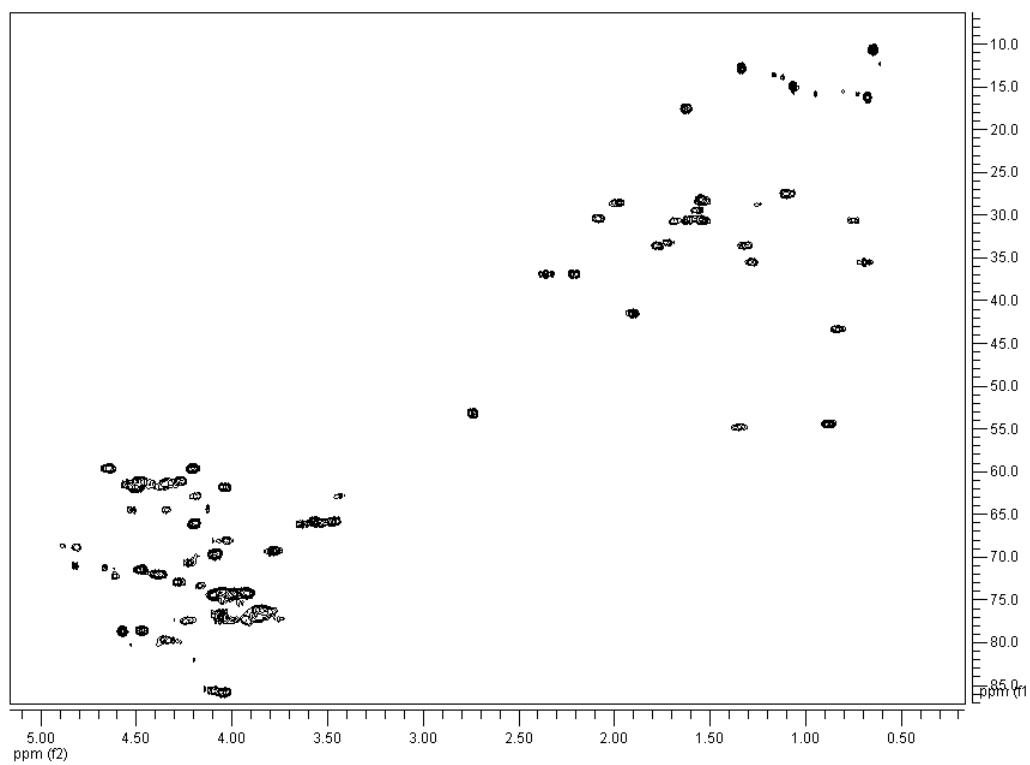


Figura 16: Ampliação da correlação heteronuclear múltiplo quântica (HMQC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

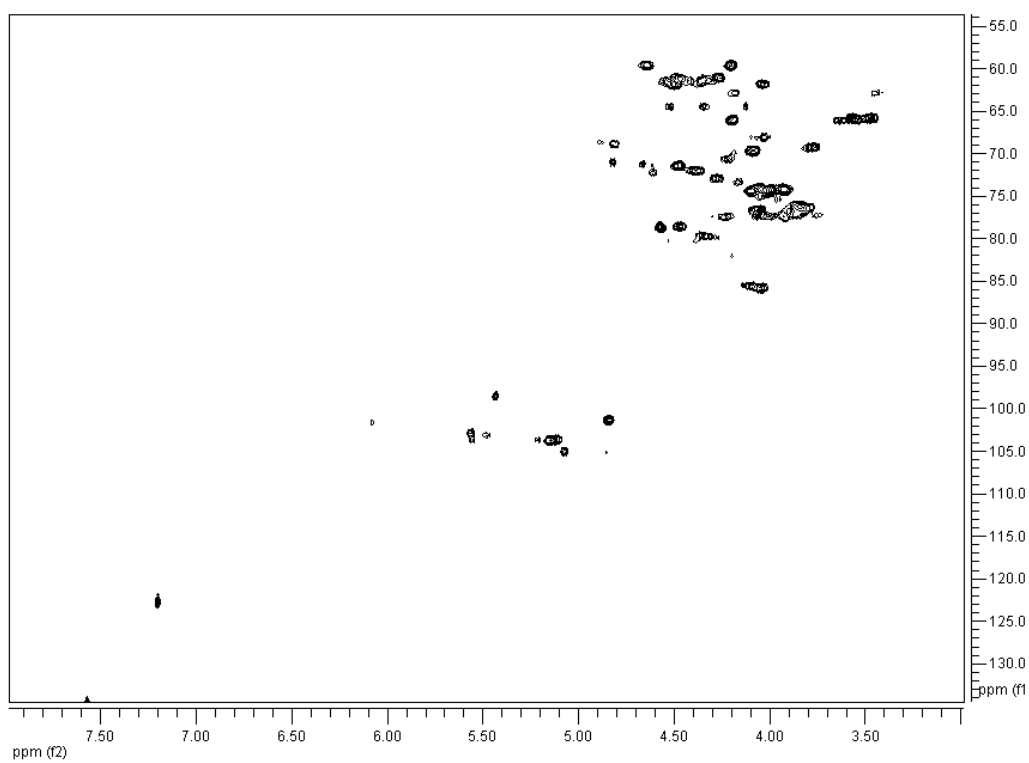


Figura 17: Ampliação da correlação heteronuclear múltiplo quântica (HMQC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

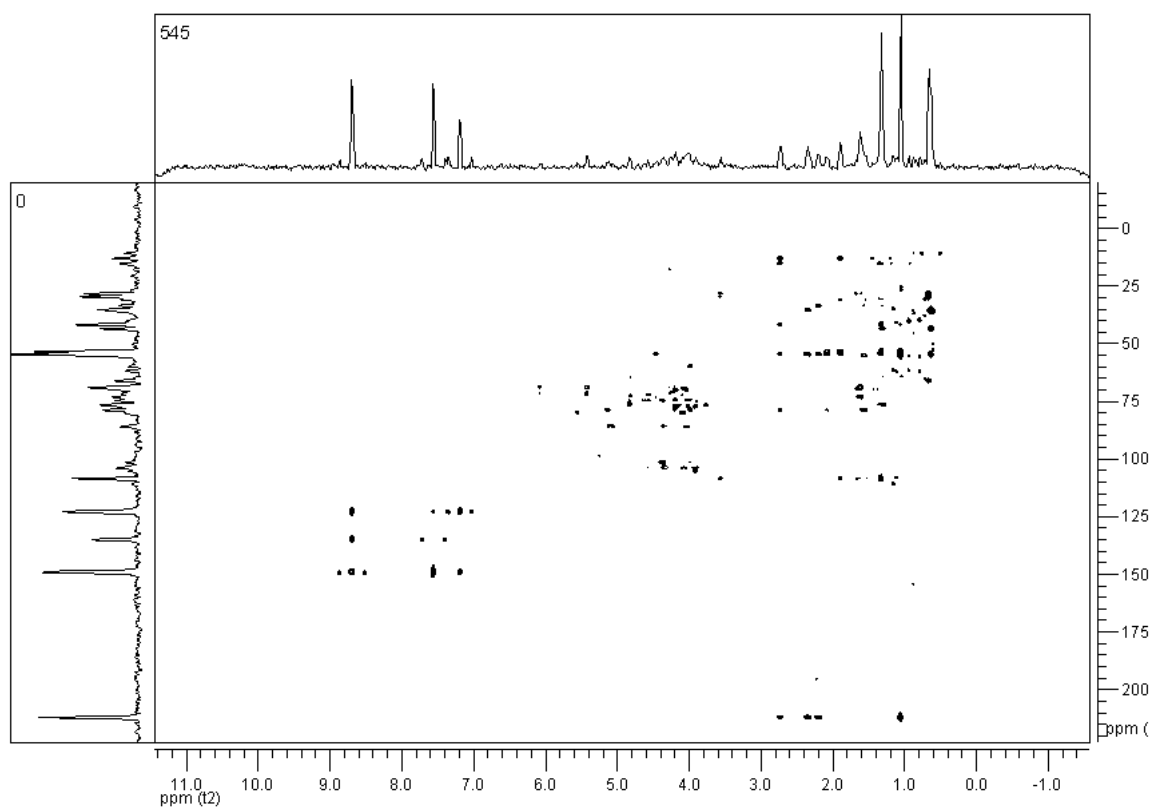


Figura 18: Correlação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de longa distância com detecção de hidrogênio (HMBC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

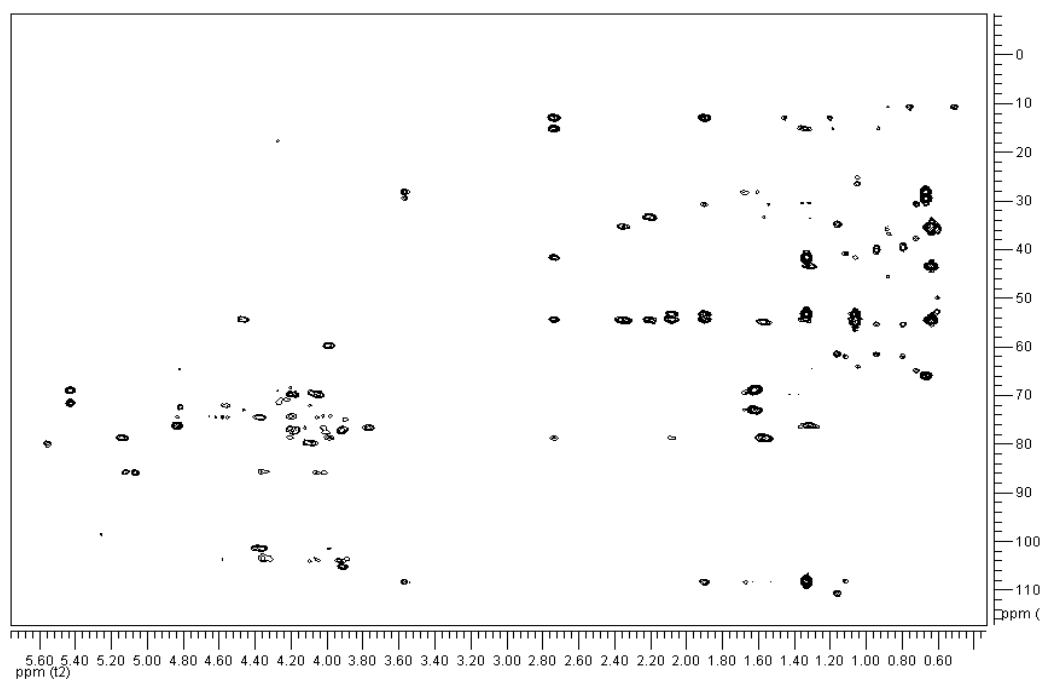


Figura 19: Ampliação da correlação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de longa distância com detecção de hidrogênio (HMBC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

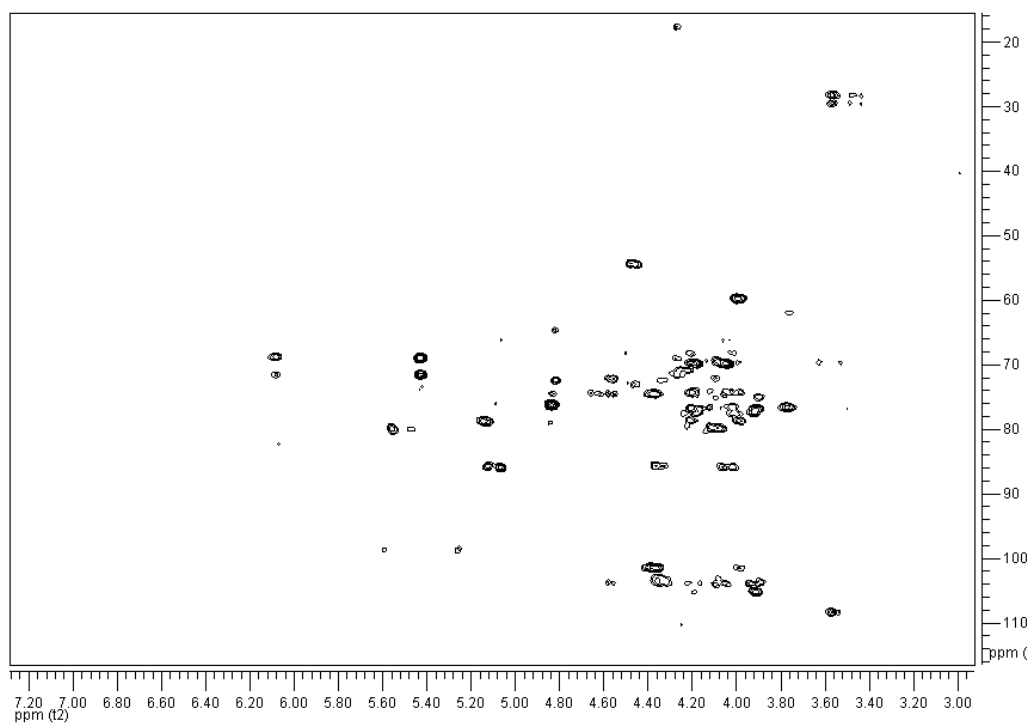


Figura 20: Ampliação da correlação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de longa distância com detecção de hidrogênio (HMBC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

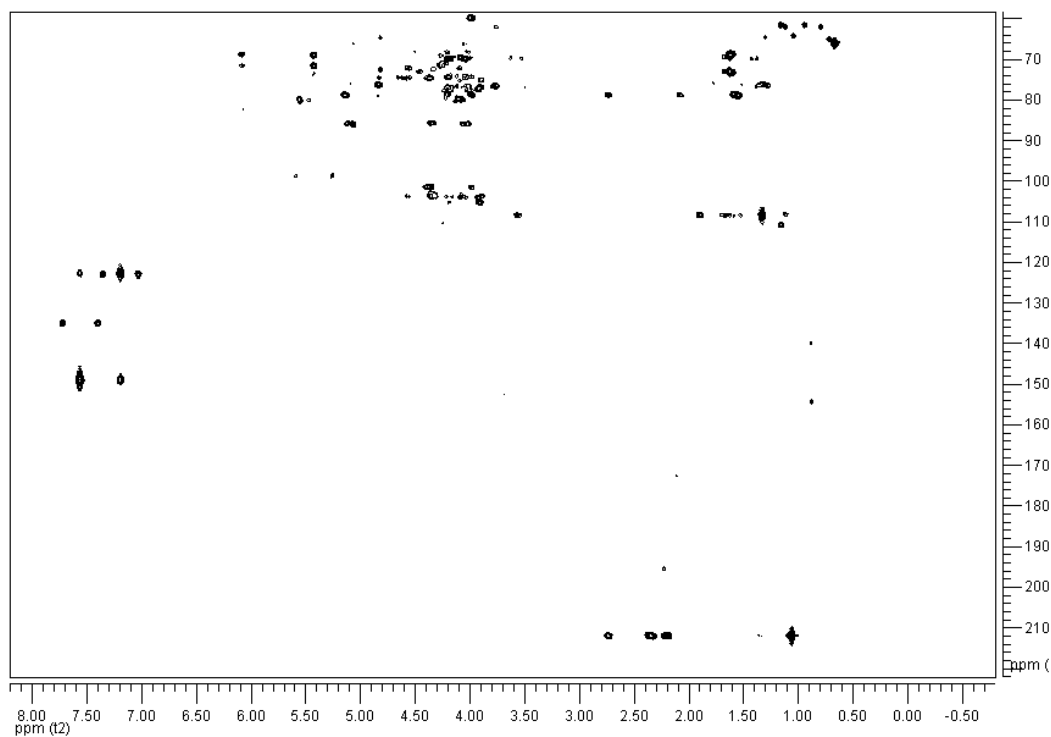
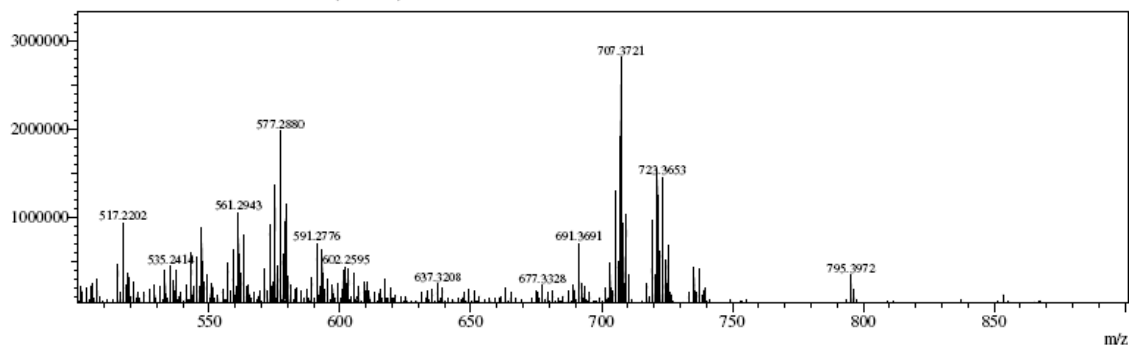


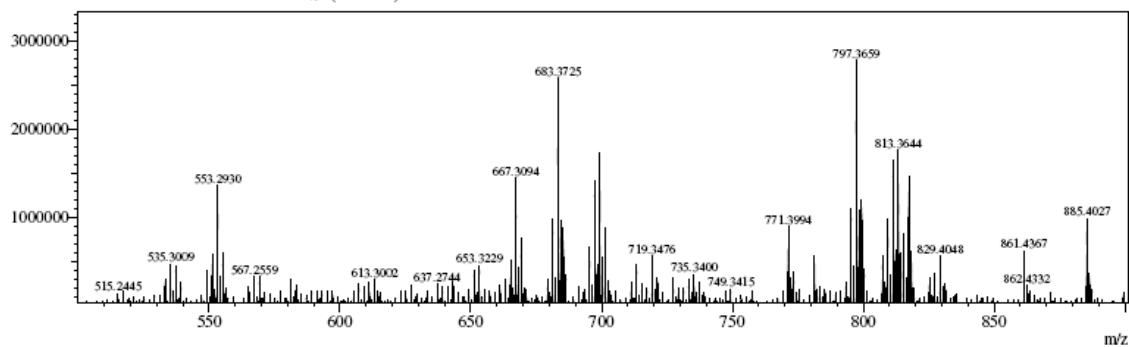
Figura 21: Ampliação da correlação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de longa distância com detecção de hidrogênio (HMBC) da MSEAE, em piridina- d_5 .

<Spectrum>

MSMS: Precursor m/z ----- /+ Base Peak 707.37(2816859)

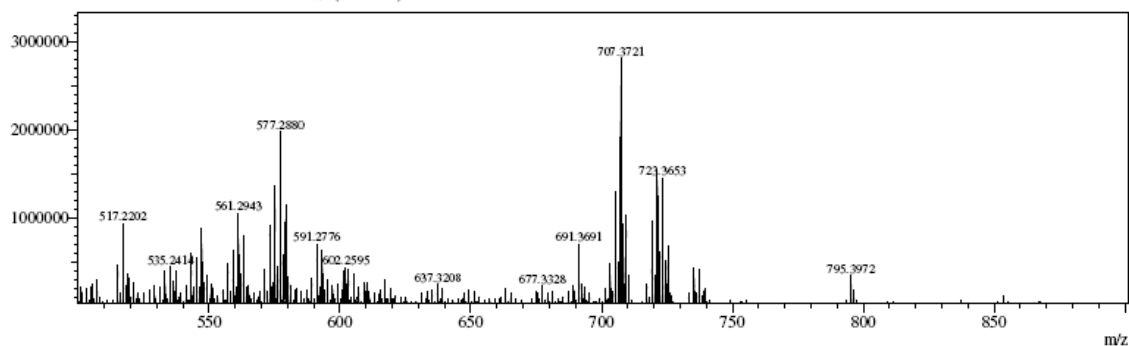


MSMS: Precursor m/z ----- /- Base Peak 797.37(2781085)



<Spectrum>

MSMS: Precursor m/z ----- /+ Base Peak 707.37(2816859)



MSMS: Precursor m/z ----- /- Base Peak 797.37(2781085)

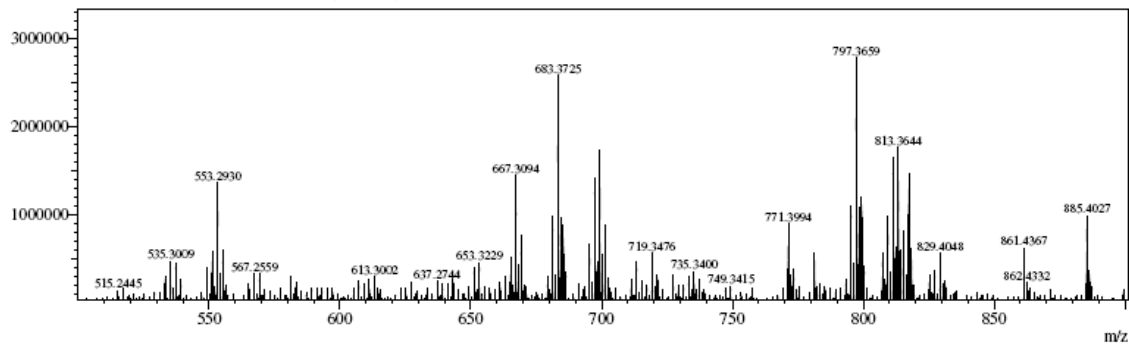


Figura 22: Espectro de massas da MSEAE, por ESI.

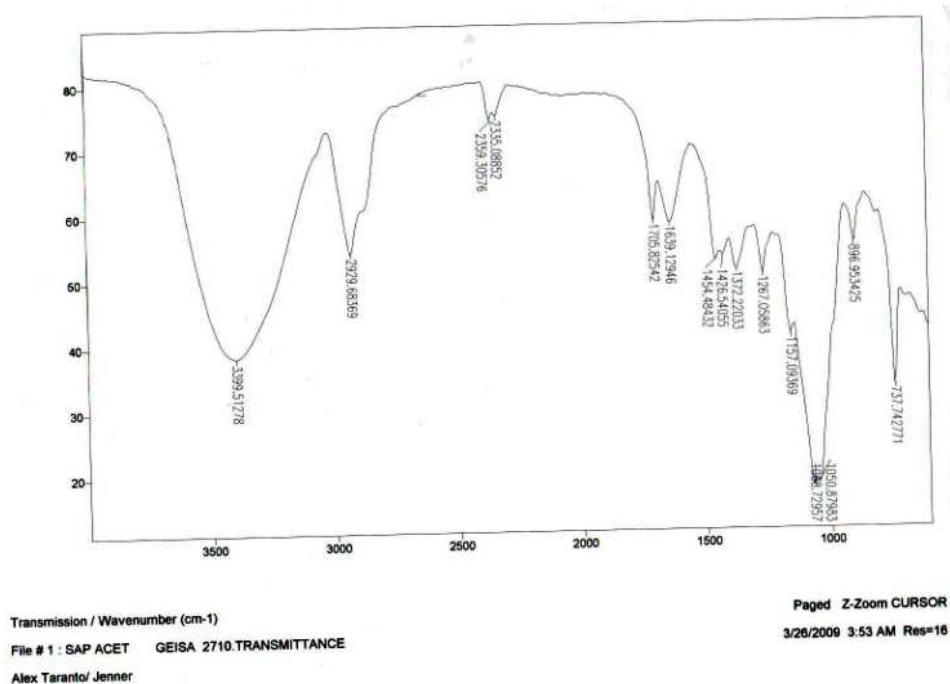


Figura 23: Espectro da região do infravermelho da MSEAE (KBr, cm^{-1})

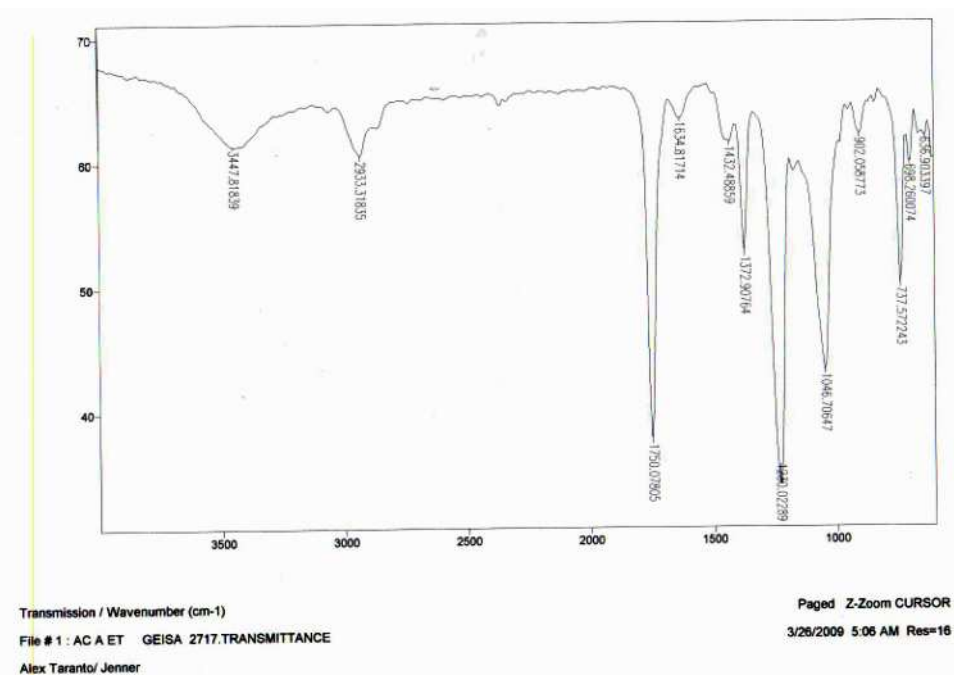


Figura 24: Espectro da região do infravermelho da MSEAE acetiladas (KBr, cm^{-1})

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Agave* é conhecido por bioproduzir as saponinas espirostanas. A caracterização química destes compostos requer o uso de uma seqüência de análises para sua inequívoca identificação a partir de uma amostra pura. Entre as espécies, *Agave sisalana* apresenta importância econômica para o Brasil, principalmente para o estado da Bahia como fornecedora de fibras duras. Estudos científicos recentes vêm comprovando as propriedades fisiológicas, imunológicas e farmacológicas das saponinas espirostanas que remete a este composto destaque até então explorado como matéria-prima de compostos esteroidais para indústria farmacêutica.

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Agave sisalana* obtidos a partir das folhas e do resíduo de sisal, descartado no processo de beneficiamento para obtenção de fibras duras apresentaram significativa inibição para *Candida albicans*, sendo inativos para as bactérias Gram positivas e negativas testadas quando comparado com os demais extratos.

A obtenção, a análise química e atividade anti-*Candida* de diferentes extratos obtidos a partir do resíduo permitiu caracterizar, através de análises de RMN ¹H, que todos os extratos apresentaram sinais característicos de saponinas espirostanas. A análise das estruturas químicas das sapogeninas por CG-EM após a hidrólise de cada extrato. Verificou-se que *Agave sisalana* somente bioproduz saponinas esteroidais espirostanas com massa molecular 416 (2 isômeros) e 430 (2 isômeros). A atividade Anti-*Candida* de cada extrato atribuído pela CIM indicou que o extrato butanólico apresentou relevante inibição (0,19 mg/mL) quando comparado com os outros extratos.

A caracterização parcial de uma mistura de saponinas espirostanas do extrato acetato de etila permitiu atribuir a sapogenina hecogenina para as saponinas. Entretanto não foi possível atribuir à seqüência dos monossacarídeos ligados a sapogenina.

A descoberta da atividade antifúngica de extratos contendo saponinas contra a levedura *Candida albicans* revelou o potencial uso do resíduo, até então descartado, como fonte de um agente antifúngico eficaz. Entretanto novas investigações são necessárias antes da sua recomendação para o uso seguro e eficaz.

Este trabalho constitui de uma ferramenta para pesquisadores que venham aplicar as saponinas presentes em espécies de *Agave* em futuros estudos.