



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

JÉSSICA MOREIRA BATISTA DA SILVA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DA RESINA EXSUDATA DE *Albizia lebeck***

SUMÉ – PB
2017

JÉSSICA MOREIRA BATISTA DA SILVA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DA RESINA EXSUDATA DE *Albizia lebbek***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

**SUMÉ – PB
2017**

S586p Silva, Jessica Moreira Batista da.
Prospecção fitoquímica, antioxidante e atividade antibacteriana do extrato da resina exsudata de *Albizia lebbek*. / Jessica Moreira Batista da Silva. Sumé - PB: [s.n], 2017.

57 f.

Orientadora: Professora Dr. Jean Cesar Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Purificação - Biotecnologia. 2. Esteróides. 3 Alcaloides. Antibiograma. I. Título.

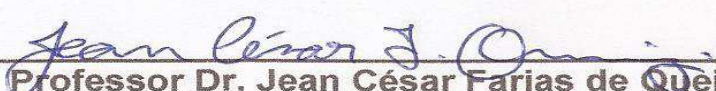
CDU: 60(043.1)

JÉSSICA MOREIRA BATISTA DA SILVA

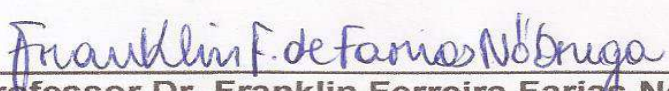
**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DA RESINA EXSUDATA DE *Albizia lebeck***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

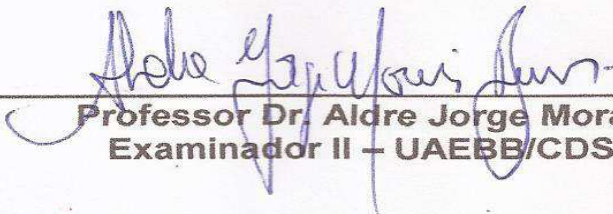
BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Orientador – UAEBB/CDSA/UFCG



Professor Dr. Franklin Ferreira Farias Nobrega
Examinador I – UATEC/CDSA/UFCG



Professor Dr. Aldre Jorge Morais Barros
Examinador II – UAEBB/CDSA/UFCG

Trabalho aprovado em: _____ de Maio de 2017.

SUMÉ - PB

A Jandira Florentino, minha mãe e amiga, pelo maior e melhor exemplo a ser seguido na vida. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Às forças no universo, que conduzem todos os fenômenos que experimentamos como humanos.

Aos meus pais, irmão e companheiro, Victor. Meus alicerces, meus amores.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz, pela orientação, paciência e ensinamentos que irei levar em minha carreira profissional.

Aos professores, verdadeiros mestres que tive a oportunidade de tê-los.

A Elder Miguel, Erika Marcela, Adriano e Norma por suas contribuições.

Aos amigos Ana Carla, Magna, Maria da Guia, Darlyson e Rodolfo. Aos colegas de curso, técnicos, funcionários e terceirizados do CDSA.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

Benjamin Disraeli

RESUMO

Albizia lebbbeck (L.) Benth. é popularmente conhecida no Brasil por coração-de-negro. Essa espécie é utilizada no tratamento de diversas doenças, despertando interesse devido à seus fitoquímicos. Este trabalho objetiva identificar a presença de metabólitos secundários presentes no extrato exsudato da *A. lebbbeck* e avaliar suas atividades antimicrobiana e antioxidante. O extrato foi obtido a partir de um processo de extração por solventes orgânicos. A partir da purificação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR), foram selecionados quatro conjuntos de substâncias, de acordo com o tempo de eluição. O estudo da atividade antibacteriana foi realizado contra as estirpes bacterianas Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*), sendo o antibiótico Cloranfenicol o controle positivo. A atividade antioxidante das substâncias testadas foi realizada pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), utilizando como curva padrão o antioxidante ácido ascórbico, cuja leitura foi realizada em um espectrofotômetro óptico. O conjunto de substâncias, denominado Área 2, que contém aproximadamente 20 diferentes compostos, que apresentaram atividade antioxidante equivalente a 0,25 mM de ácido ascórbico. Todas as áreas purificadas apresentaram alguma atividade antibacteriana, com formação de halo de inibição do crescimento com cerca de 1mm de diâmetro, com destaque para a Área 2, com formação de halo para Gram positiva e Gram negativa. As análises fitoquímicas demonstraram que a Área 2 contém esteroides e alcaloides, mas não contém saponinas.

Palavras - chave: Metabólitos Secundários. Alcaloides. Esteroides. Purificação. Antibiograma.

ABSTRACT

Albizia lebeck (L.) Benth. It is popularly known in Brazil for Heart of Black. This species is not used in the treatment of diseases. This work aims to identify a presence of non-exudate secondary metabolites of *A. lebeck* and to evaluate its antimicrobial and antioxidant activities. The extract was obtained from a process of extraction by organic solvents. From the purification via Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC-FR), four sets of substances were selected according to the elution time. The study of antibacterial activity was performed against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacterial strains, with the antibiotic Cloranfenicol being the positive control. The antioxidant activity of the tested was performed by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method, using as standard curve the antioxidant ascorbic acid, which was read in an optical spectrophotometer. The food set, denominated Area 2, contains about 20 different compounds, which presented antioxidant activity equivalent to 0.25 mM of ascorbic acid. All the purified areas present an antibacterial activity, with halo formation of inhibition of growth with around 1mm of diameter, emphasizing an Area 2, with formation of halo for Gram positive and Gram negative. As phytochemical analyzes have shown that Area 2 contains steroids and alkaloids but does not contain saponins

KEYWORDS: Secondary metabolites. Alkaloids. Steroids. Biotechnology. Purification. Antibiograma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Remédio para alergia composto por extrato de <i>A. lebeck</i>	21
Figura 2 - Estabilizante do Sistema Nervoso Central composto por extrato de <i>Albizia</i>	21
Figura 3 - Resina coletada da <i>Albizia Lebeck</i> no CDSA.....	23
Figura 4 - Isopreno, estrutura de base	25
Figura 5 - Biossíntese dos Terpenos	26
Figuras 6 - Principais monoterpenos	28
Figura 7 - β -Cadineno.....	28
Figura 8 - Estrutura química do esqualeno.....	29
Figura 9 - A transformação de esqualeno em lanosterol	29
Figura 10 - Um dos carotenóides mais conhecidos: β -caroteno.....	30
Figura 11 - Um dos carotenos mais conhecidos: Licopeno	30
Figura 12 - Estrutura da borracha.....	31
Figura 13 - Localização da área do CDSA	35
Figura 14 - Cromatógrafo Perkin-Elmer.....	36
Figura 15 - Resina moída e armazenada em frascos hermeticamente fechados.....	37
Figura 16 - Fluxograma de preparação da resina da <i>A. lebeck</i>	38
Figura 17 - Placas de Petri com meio ADCM contendo <i>S. aureus</i> e <i>E.coli</i> , após período a 30°C	41
Figura 18 - Extrato da resina exsudada purificado em quatro diferentes áreas após o teste de atividade antioxidante.	48
Figura 19 - Resultado do teste fitoquímico para Esteróides.	51
Figura 20 - Solução de Erdmann reagindo com o extrato exsudato purificado de <i>A.lebecck</i>	51
Figura 21 - Resultado da análise fitoquímica para terpenóides	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura Ágar, Dextrose, Caseína e Malte (ADCM).	40
Tabela 2 - Ação bacteriana dos extratos purificados	46
Tabela 3 - Análise fitoquímica qualitativa de extrato da resina exsudata de <i>Albizia lebbbeck</i>	50
Tabela 4 – Relação entre compostos fitoquímicos e indicadores de cor.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Cromatograma gerado a partir da corrida dos extratos provenientes da resina da *A. lebbeck*.....44
- Gráfico 2** - Cromatograma dos extratos provenientes da resina da *A. lebbeck* dividido em suas respectivas áreas purificadas.....45
- Gráfico 3** - Eliminação de radicais DPPH por diferentes áreas da resina exsudata purificada de *A. lebbeck* em comparação com a eliminação de radicais DPPH do Ácido Ascórbico49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – Microlitro

μmol – Micromol

μm – Micrometro

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABS – Absorbância

ADCM – Ágar Dextrose Caseína Malte

Atm – Atmosfera

ATP – Trifosfato de Adenosina

BOD – Biochemical Oxygen Demand

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

CLAE-FR – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

C_n – Número de Carbonos

CO₂ – Dióxido de Carbono

DMAPP – Pirofosfato de dimetilalilo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

FDA – Food and Drug Administration

GGPP – Pirofosfato de geranylgeranilo

g – Grama

h – Hora

kg – Quilograma

L – Litro

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

q.s.p – Quantidade suficiente para

RNA – Ácido ribonucleico

UAEB – Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

UV – Radiação solar ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 OS PRODUTOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS	20
3.2 RESINAS NATURAIS.....	22
3.3 TERPENOS.....	25
3.3.1 Definição	24
3.3.2 A Biossíntese dos Terpenos	24
3.3.3 Estrutura dos Terpenos	25
3.3.4 CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENOS.....	26
3.3.4.1 Hemiterpenos	26
3.3.4.2 Monoterpenos	26
3.3.4.3 Sesquiterpenos	27
3.3.4.4 Diterpenos	28
3.3.4.5 Triterpenos	28
3.3.4.6 Tetraterpenos	29
3.3.4.7 Politerpenos.....	30
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA RELAÇÃO COM OS TERPENOS.....	31
3.4.1 Definição	31
3.4.2 LOCALIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NAS PLANTAS	31
3.4.3 Propriedades Físico-químicas dos Óleos Essenciais	31
3.4.4 Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais	32
3.4.5 Atividade Antioxidante.....	32

3.4.6 Atividade Antimicrobiana	33
3.5 OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	33
3.5.1 EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGANICOS.....	33
3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	35
4.2 MATERIA-PRIMA.....	35
4.2.1 Moagem da resina vegetal no moinho de facas.....	36
4.2.2 Extração por solvente	37
4.2.3 Liofilização	37
4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLAE	37
4.4 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.4.1 Meio de cultura	38
4.4.2 Preparo dos discos de papel.....	39
4.4.3 Preparo do inóculo bacteriano.....	39
4.4.4 Teste antibiograma	40
4.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
4.5.1 Curva de DPPH.....	41
4.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	41
4.6.1 Teste para identificação de Esteroides.....	41
4.6.2 Teste para identificação de Alcaloides	42
4.6.3 Teste para identificação de Terpenoides.....	42
4.6.4 Teste para identificação de Saponinas.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Em todas as regiões do mundo, as plantas têm ocupado lugar primordial na alimentação, perfumaria e na área terapêutica. A história das plantas medicinais está associada à evolução das civilizações. A China, berço da fitoterapia, a Índia, Oriente Médio, Egito e Grécia, o destaque no uso é conhecido das civilizações faraônica durante a qual plantas medicinais ocuparam lugar de destaque (KELLY, 2009).

Em muitos países, a medicina tradicional tem desempenhado um papel chave no bem-estar e na saúde das suas populações. Mais de 25% dos medicamentos prescritos são baseados em plantas ou de seus derivados. (HEDBERG, 1989). Portanto, as plantas são fontes de várias moléculas que podem ser utilizadas para vários fins, incluindo terapia.

O Brasil possui uma das maiores biodiversidade em toda sua extensão territorial. Um grande desafio da ciência e da sociedade moderna é explorar esse patrimônio químico e biológico de forma sustentável (FEITOSA, 2009). O interesse em drogas de origem vegetal é devido entre outras, a ineficiência frequente da medicina convencional, devido ao possível desenvolvimento de efeitos colaterais de drogas sintéticas, e grande percentagem da população pobre do mundo não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional.

Uma das espécies vegetais mais utilizadas é a *Albizia lebbbeck*. Praticamente toda ela é utilizada: folhas são utilizadas na alimentação, a resina para a fabricação de cosméticos e suas sementes possui grande utilização como fitoterápicos. A espécie *A. lebbbeck* também é forte agente de remediação, sendo aplicados em processos de biorremediação do solo, juntamente com outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (KOKILA, 2013).

A *Albizia lebbbeck* é uma planta nativa da África tropical, Ásia e norte da Austrália. É amplamente adaptável dentro de áreas subúmidas, regiões semiáridas e áreas subtropicais, onde há uma estação seca acentuada e uma estação chuvosa confiável. (DUKE, 1983; LOWRY, 1992 apud COOK, 2005). *Albizia lebbbeck* pode atingir uma altura de 30 m e diâmetro de 1 m. As flores aparecem logo após as folhas novas, são brancas e perfumadas. O gênero tem o nome de Filippo del Albizzi, um nobre que em 1749 introduziu *A. julibrissin* em cultivo. O nome da espécie é árabe, 'laebach'. Quando agitado pelo vento, as vagens e as sementes

fechadas produzem um chocalho comparado à conversa das mulheres (ORWA, 2009).

A *Albizia lebbbeck* é bastante utilizada pela medicina tradicional indiana e seus usos podem ser comprovados. No entanto, mesmo as plantas de mesma espécie e gênero podem ter diferentes constituições, devido ao ambiente em que estão inseridas e microrganismos presentes no solo.

As proporções de compostos voláteis e não voláteis dos constituintes das plantas, seu crescimento e desenvolvimento podem variar mesmo entre espécies do mesmo gênero como em relação aos nutrientes presentes no solo, assim como o tipo do solo utilizado (LANGENHEIM, 2003).

Os microrganismos endofíticos estão envolvidos nas diferenças entre plantas da mesma espécie e gênero, pois estimulam o crescimento das plantas, ajudando-as a se desenvolver, podendo favorecer na absorção de nutrientes. (WEYENS, 2009; COMPANT, 2010; ABREU-TARAZI, 2010; DUDEJA, 2012). Estes microrganismos auxiliam as plantas em seu desenvolvimento e são responsáveis pelos diferentes componentes entre plantas de mesma espécie cultivadas em diferentes regiões.

Diante do que foi exposto, este trabalho tem como objetivo identificar, isolar e caracterizar metabólitos secundário da *Albizia lebbbeck* cultivada no Centro Acadêmico de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido pertencente à Universidade Federal de Campina Grande em Sumé-PB, além de avaliar suas atividades antimicrobiana e antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é identificar a presença de metabólitos secundários presentes no exsudato da *Albizia lebbbeck* e avaliar suas atividades antimicrobiana e antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os metabólitos secundários da resina de *A. lebbbeck* por meio de cromatografia líquida;
- Avaliar as atividades antioxidante e antibacteriana; e
- Realizar uma análise fitoquímica preliminar dos metabólitos presentes na resina da *Albizia lebbbeck*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 OS PRODUTOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS

O trabalho farmacológico destacou o uso de plantas medicinais para a extração de compostos bioativos na indústria farmacêutica. A ideia industrial nesta abordagem traz uma base de inovação para o desenvolvimento de novas drogas que podem levar a economia de tempo na pesquisa e desenvolvimento de processos (FLEURETIN, 1993). Os pesquisadores voltados ao estudo de plantas medicinais observam cuidadosamente o crescente sucesso da antiga farmacopeia, que, em todo o mundo, aparece como uma alternativa à medicina química, uma vez que nem todos podem ter acesso à farmacopeia tradicional.

A importância dos produtos naturais reside na própria função biológica na qual são sintetizados. Eles podem ser úteis como agentes terapêuticos, servir de modelos para a preparação de substâncias bioativas, como matéria-prima para a síntese de substâncias de interesse farmacológico ou interesse industrial (RAVELO, 2009).

Com a evolução das espécies, as plantas se tornaram fonte inesgotável de produtos que podem ser utilizados como medicamentos. Boa parte das plantas existentes não foi estudada e abrem perspectiva para futuras descobertas de métodos mais modernos e eficientes que irão auxiliar na síntese de novos medicamentos no futuro muito próximo (PHILLIPSON, 2003).

A função dos produtos de origem natural não reside apenas em servir como modelo para novos medicamentos, eles possuem características ímpares dos produtos sintéticos e passam a ser parte da síntese de novos medicamentos. Em um estudo recente, analisou-se a origem de novas drogas pela *Food and Drug Administration* (FDA), entre 1981 e 2008. Este estudo mostra que 57,7% correspondem aos produtos naturais e seus derivados (FDA, 2008).

A indústria de medicamentos concentra grande esforço na obtenção das fontes de produção quando se fala em Fitoterápicos. O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta e mesmo com toda essa riqueza de multidiversidade ambiental, o problema de desenvolvimento de medicamentos a partir de recursos naturais consiste muitas vezes na identificação indevida das espécies, composição química errônea, contaminantes e uma série de

precariedades. A legislação impõe a indústria que os métodos e alternativas utilizados na formulação de novos produtos tenham segurança garantida (MIGUEL, 2000).

É sabido por todos que desde a antiguidade o homem passou a utilizar as plantas como objeto de cura para diversas enfermidades, além de utilizarem como fonte de alimentação. O uso folclórico das plantas trouxe curiosidade e caminhos a serem trilhados pelos pesquisadores. Com exemplo da *A. lebbeck*, uma árvore bem conhecida no subcontinente indiano pela sua gama de utilizações. *A. lebbeck* é usada no sistema tradicional indiano e medicina popular, assim como para o tratamento de várias patologias inflamatórias, tais como a asma, artrite e queimaduras. Também é relatado na medicina popular indiana que *A. lebbeck* tem atividades antisséptica, atividades antidisentérica e antituberculose (Farmacopeia Ayurveda da Índia de 2001). Além disso, saponinas de *A. lebbeck* mostraram ser úteis no tratamento de doenças como Alzheimer e o Parkinson (SANJAY, 2003).

A casca tem de sabor acre e seu extrato apresentou atividade antimicrobiana. O ativo constituinte do extrato da casca é glicosídeo de antraquinonas que causam o vazamento dos componentes citoplasmáticos (GANGULI; BHATT, 1993). Ele também tem efeito imunomodulador (BARUAH, 2000). Além disso, é utilizada para a bronquite, lepra, paralisia e infecções por helmintos (Farmacopeia Ayurveda da Índia, 2001). A administração oral de saponina isolada a partir da casca de *A. lebbeck* na dose de 50mg / kg por dia, em ratos albinos machos, mostrou uma diminuição significativa no peso dos testículos, vesícula seminal e próstata ventral (GUPTA, 2005).

Folhas foram identificadas como tendo atividade anticonvulsivante (KASTURE, 1996) e efeito nootrópico (CHINTAWAR, 2002), que pode ser devido à presença de certos compostos importantes como alcaloides e flavonoides. Além disso, o extrato aquoso de folhas de *A. lebbeck* mostrou atividade antioxidante em ratos diabéticos (RESMI, 2006). As saponinas das sementes de *A. lebbeck* exibiram propriedades antiovatória. As sementes têm efeito anti-fertilidade em ratos machos (SINGH et al., 1991). Além disso, as flores estão sendo comumente usadas para tratar a ansiedade, depressão e insônia na medicina tradicional chinesa (KANG, 2007). Medicamentos feitos com extratos da *Albizia* podem ser vistos nas figuras 1 e 2.

Figura 1 - Medicamento para alergia composto por extrato de *A. lebbeck*.



Fonte: Natural healthy concepts, 2017.

Figura 2 - Medicamento estabilizante do sistema nervoso central composto por extrato de *Albizia*.



Fonte: Natural healthy concepts, 2017.

3.2 RESINAS NATURAIS

Resinas podem ser originadas de terpenos, que é uma classe de moléculas tendo diferentes grupos policíclicos funcionais. Estes compostos estão presentes nos organismos vivos, mas alcançam a sua maior diversidade funcional e estrutural no reino vegetal. Estes terpenos asseguram a fluidez da membrana, transporte de

elétrons, glicosilação de proteínas e a regulação do desenvolvimento de células, são essenciais para o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência de todos os organismos vivos (MCCASKILL; CROTEAU, 1998).

As resinas podem ser de origem fisiológica, isto é, naturalmente produzidas por plantas saudáveis (também chamados de resinas pré-formados, não traumáticos ou constitutivos), formadas a partir de doença ou a partir de exsudatos. No último caso, estes são exsudatos de defesa da planta contra feridas ou de ataques por agentes patogênicos (HOVANEISSIAN, 2006), chamada de resina induzida, traumática ou de reação (LAMBERT, 2003). Dependendo das espécies, as composições de acordo com os dois tipos de resina depende da sua origem botânica, as condições geográficas e climáticas no seu ambiente (CHIAVARI, 1995).

As resinas podem ocorrer em misturas homogêneas com óleos voláteis. Dependendo da quantidade relativa do óleo volátil na mistura, os óleos-resinas podem ser lipofílicas ou hidrofílicas. Em geral, observa-se uma pequena quantidade de exsudato natural nas árvores que contêm óleo-resinas, devido à agressão por insetos, à quebra de ramos ou outras lesões, podendo obter essa substância pela incisão artificial do córtex ou mesmo da madeira (ROBBERS, 1997). Dividem-se em lipofílicos e hidrofílicos, embora não existam fronteiras que os delimitem (SJOSTROM, 1981).

As substâncias extraíveis das árvores constituem uma fonte importante de fitoquímicos. O desenvolvimento florestal deve centrar sua atenção em obter das árvores tudo o que esta pode proporcionar ao homem, sempre que os mecanismos que se utilizam para tal fim sejam respeitosos com o ambiente.

A maioria das enzimas envolvidas na biossíntese de terpenos em plantas é codificada por genes múltiplos: por exemplo, a distribuição das diferentes isoformas destas enzimas pode ser restrita a certos compartimentos subcelulares, permitindo regulação sutil, mas flexível da biossíntese de terpenos. A via metabólica, responsável pela síntese de sesquiterpenos e triterpenos é citoplasmática, enquanto GAP-piruvato, responsável pela biossíntese do isopreno, mono e diterpenos, bem como carotenoides, tem lugar nos plastídios. Essas organelas responsáveis pela fotossíntese e armazenamento de muitas classes de compostos que estão presentes apenas no citoplasma. Deve notar-se que este esquema é de biossíntese simplista, dada à existência de metabolitos citoplasmáticos: as vias de acetato-

mevalonato e GAP-piruvato estão intimamente interligados (CROTEAU, 2002; LANGENHEIM, 2003; MCCASKILL, 1998).

Figura 3 - Resina coletada da *Albizia Lebbeck* no CDSA.



Fonte: Elder Miguel, 2017.

A resina possui atividade contra herbívoros e patógenos que atacam a planta, produzindo resposta tóxica ou inibidora. Mono e sesquiterpenos, também são utilizados para atrair os organismos benéficos, tais como os predadores de herbívoros prejudiciais para a planta (LANGENHEIM, 2003). Na Figura 3 temos o exemplo da resina exsudada da *A. lebbeck*.

As resinas têm muitas funções relacionadas à planta, incluindo a de agente de cura para a lesão (LAMPERT, 2003). Elas também protegem a planta da dessecação, radiação UV e temperatura elevada, e isso principalmente em folhas jovens e caules (LANGENHEIM, 2003).

As resinas são produzidas endogenamente nas células epiteliais especializadas conhecidas como células do parênquima que estão presentes em muitas partes da planta como raízes, folhas, cascas e dos tecidos lenhosos. Estas células secretoras irão dissociar e, assim, formar pequenas aberturas denominadas bolsas arredondadas ou canais alongados, de aparência, dimensão e distribuição

variáveis. Estas cavidades são a aparelhagem de secreção que armazenam produtos de secreção antes de infiltrar-se através da casca natural ou devido à lesão. Neste último caso, a quantidade de resina segregada é diretamente proporcional à importância do trauma (HONVANEISSIAN, 2006; LAMPERT, 2003; LANGENHEIM, 2003).

3.3 TERPENOS

3.3.1 Definição

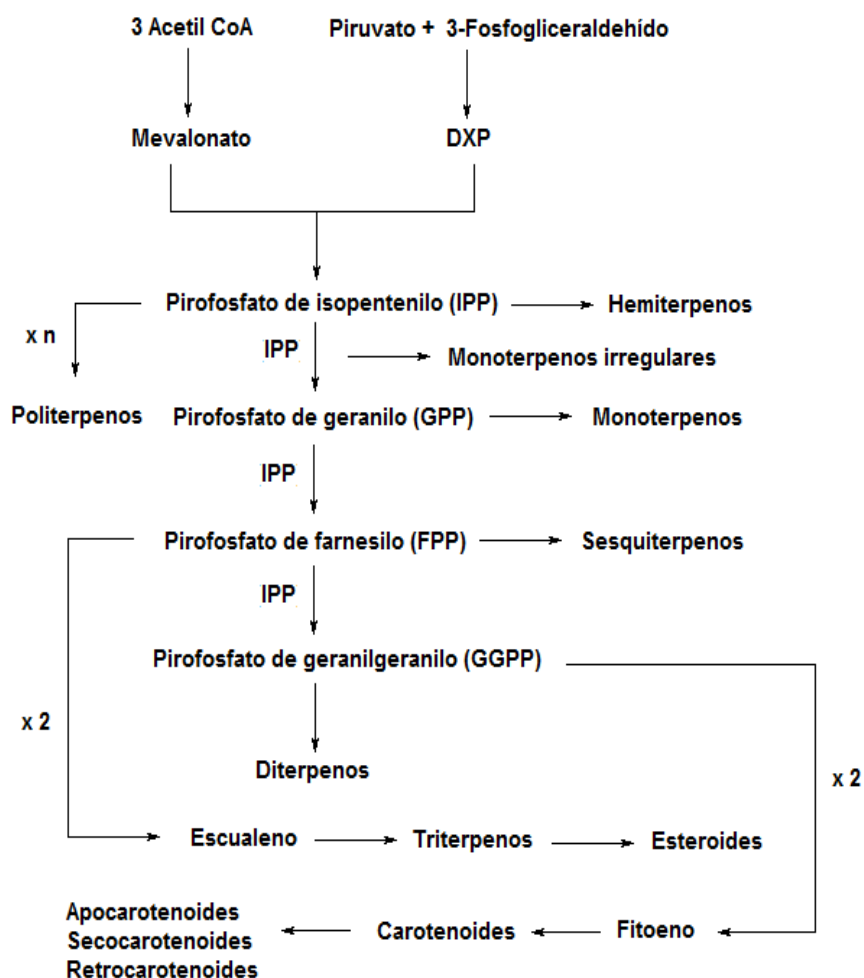
O termo terpeno vem de sua origem histórica da árvore de carvalho (AYAD, 2008). Sintetizada por plantas, organismos marinhos, fungos e até mesmo animais (BENAÏSSA, 2011). A operação destes compostos foi realizada como óleos extraídos de plantas (óleos essenciais) por meio de destilação (MALECKY, 2005).

3.3.2 A Biossíntese dos Terpenos

A biossíntese de terpenos é iniciada pela ativação por hidrólise de ATP isopreno, ilustrado na Figura 5. O ácido mevalônico (MVA) é a chave para a biossíntese de terpenoides. A condensação de três moléculas de acetil-CoA forma o β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-reductase, em seguida, a redução do último dará origem ao MVA que é subsequentemente ativado por enzima específica. O MVA é convertido em pirofosfato isopentenil (PIP) ou isopreno ativo. Este PIP é isomerizado para pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP).

A condensação de uma molécula (DMAPP) com uma molécula (PIP) sintetiza os monoterpenos. O acoplamento do último com uma nova molécula (PIP) leva a sesquiterpenos que podem interagir com outra molécula (PIP), a forma precursora de diterpenos C-20. Por outro lado, o acoplamento redutivo do sesquiterpeno é o precursor do esqualeno C-30 cíclicos, triterpenos e esteroides (AYAD, 2008).

Figura 5: Biossíntese dos Terpenos

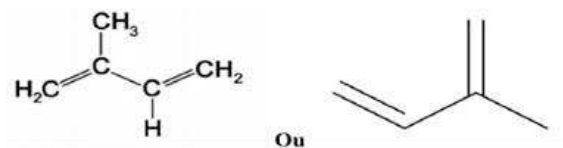


Fonte: (AYAD, 2008)

3.3.3 Estrutura dos Terpenos

Os terpenos são os hidrocarbonetos naturais, a sua estrutura é cíclica ou de cadeia aberta: sua fórmula molecular é $(C_5H_x)_n$ no qual o x varia de acordo com o grau de introdução da molécula e n pode tomar valores de (1 - 8), exceto politerpenos que podem chegar a mais de 100 (borracha). A estrutura de base dos terpenos são os isoprenos (C_5H_8), mostrado na Figura 4. O termo terpenoides é composto de isoprenos contendo em sua estrutura oxigênio e designa um grupo de substâncias como os esqueletos de terpenos com funções de um ou mais produtos químicos (álcool, aldeído, cetona, lactona, etc.) (MALECKY, 2005; BENAÏSSA, 2011).

Figura 4: Isopreno, estrutura de base.



Fonte: (KHENAKA, 2011)

3.3.4 Classificação dos terpenos

3.3.4.1 Hemiterpenos

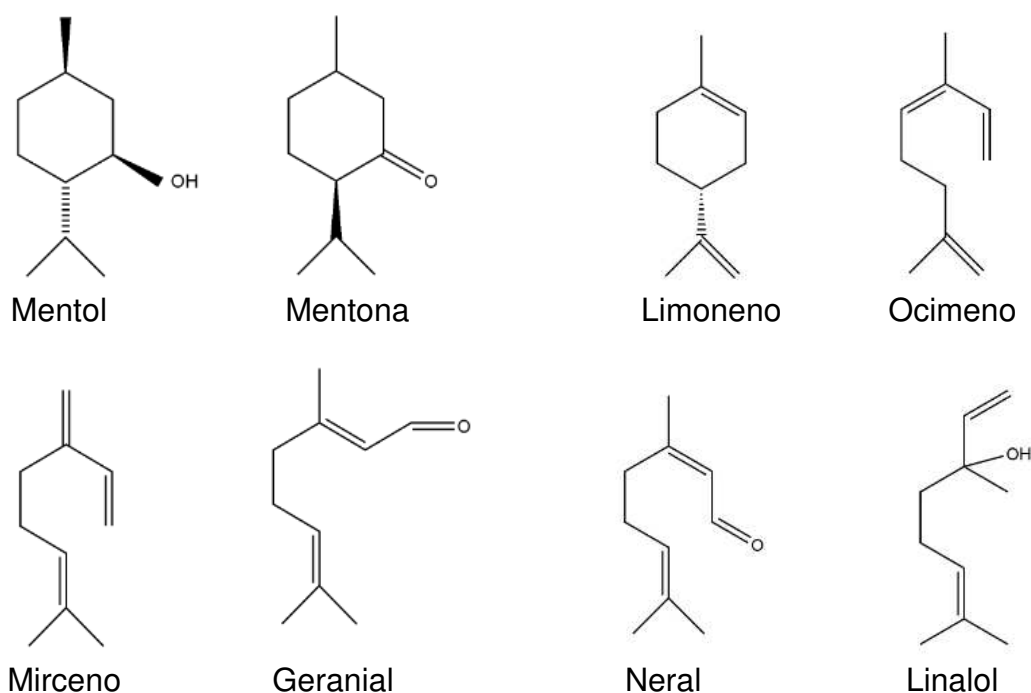
Na natureza, há poucos compostos naturais que têm a fórmula C₅ ramificada. Entre certos compostos naturais encontrados em plantas que podem ser considerados Hemiterpenos, apenas o isopreno possui todas as características biogênicas dos terpenos (MALECKY, 2005).

3.3.4.2 Monoterpenos

Os monoterpenos são os componentes mais simples de terpenos, os quais em sua maioria são encontrados em óleos essenciais (90% de óleos essenciais são monoterpenos) (AYAD, 2008).

Estas são pequenas moléculas, muito pouco funcionalizadas, muito perfumadas, a maioria das atividades biológicas é reconhecida pelas características das plantas que lhe deram origem (Belbache, 2003). Eles compreendem dez átomos de carbono (C₁₀) e são derivados da condensação de duas unidades de isopreno, por acoplamento de modo "cabeça-cauda" (AYAD, 2008).

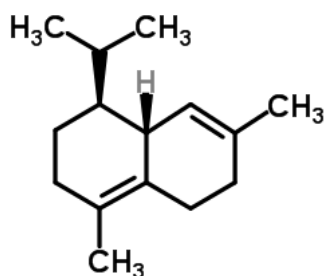
Mais de 900 monoterpenos conhecidos são, principalmente, em três categorias estruturais: monoterpenos (acíclicos lineares), monoterpenos com um único anel e aqueles com dois ciclos (MALECKY, 2005; BELBACHE, 2003). Na Figura 6 temos os principais monoterpenos utilizados nas indústrias de alimentos e cosméticos.

Figura 6 - Principais monoterpênos

Fonte: (AYAD, 2008).

3.3.4.3 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos formam uma série de compostos que contêm 15 átomos de carbono, eles estão na forma de hidrocarbonetos, tais como β -Cadineno (BELBACHE, 2003), ou sob a forma de hidrocarbonetos oxigenados, tais como álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos e lactonas. Sesquiterpenos e monoterpênos são muitas vezes misturados em óleos essenciais de plantas (AYAD, 2008). Eles podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos ou policíclicos (BELBACHE, 2003; MALECKY, 2005). Especialmente encontrados em plantas superiores, mas também em invertebrados (BENAISSA, 2011). Eles são os mais diversificados dos terpenos por conter mais de 3000 moléculas, as suas características estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: β -Cadineno.

Fonte: (BALBACHE, 2003)

3.3.4.4 Diterpenos

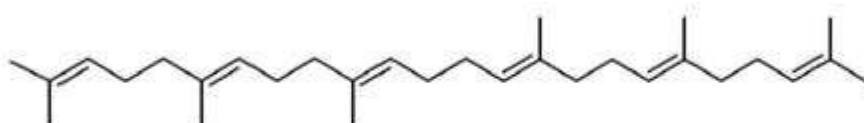
Os diterpenos são substâncias com 20 átomos de carbono (C₂₀), desenvolvidos a partir de 4 unidades de isopreno; eles são formados a partir seu precursor, pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP) (MALECKY, 2005).

São comuns em plantas superiores, também estão presentes em alguns insetos e em vários organismos marinhos. Eles podem ser encontrados mesmo em resinas, exsudato, gomas naturais e giberelinas (AYAD, 2008).

3.3.4.5 Triterpenos

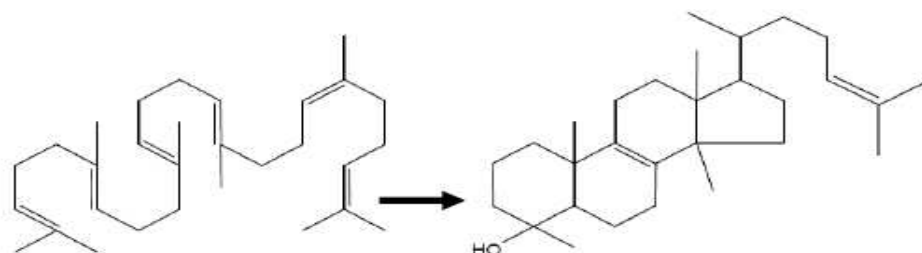
Os triterpenos são moléculas com 30 átomos de carbono. Eles têm como precursor o esqualeno, mostrado na Figura 8. Por exemplo, Lanosterol que é então convertido em colesterol (Figura 9) (BALBACHE, 2003).

Existe mais de 1700 triterpenos na natureza, a maioria dos quais estão sob a forma tetracíclica ou pentacíclica, sendo a forma acíclica muito rara (MALECKY, 2005).

Figura 8 - Estrutura química do esqualeno.

Fonte: (BALBACHE,2003; AYAD,2008)

Figura 9 - A transformação de esqualeno em lanosterol.



Fonte: (BALBACHE, 2003; AYAD, 2008)

3.3.4.6 Tetraterpenos

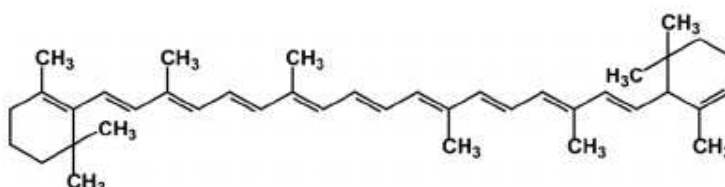
Os tetraterpenos contêm uma longa cadeia de 40 átomos de carbono, ligações duplas de configuração "trans", cujas extremidades são cadeias ou ciclos abertos (AYAD, 2008).

Os mais conhecidos são tetraterpenos carotenoides. Eles representam grande grupo de pigmentos naturais de amarelo, laranja e vermelho. Eles são comuns em plantas, algas e vários microrganismos. Atualmente, cerca de 750 carotenoides foram identificados na natureza (AYAD, 2008).

As moléculas dos mais conhecidos carotenoides são:

A. O cíclico β -caroteno, Figura 10, por conseguinte, a sua cor, que dá as cenouras, desempenha papel crucial no crescimento e na visão, a oxidação provoca a formação de duas moléculas, um aldeído da retina e a sua redução dará origem a vitamina A.

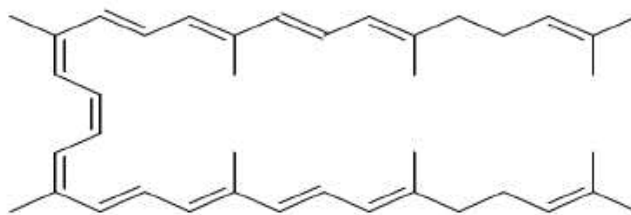
Figura 10: Um dos carotenoides mais conhecidos: **β -caroteno**



Fonte: (BALBACHE,2003; AYAD,2008)

B. Licopeno, Figura 11, foi encontrado no tomate maduro (0,02 g / kg). (Belbache, 2003).

Figura 11 - Um dos carotenos mais conhecidos: o **Licopeno**



Fonte: (BALBACHE,2003; AYAD,2008)

3.3.4.7 Politerpenos

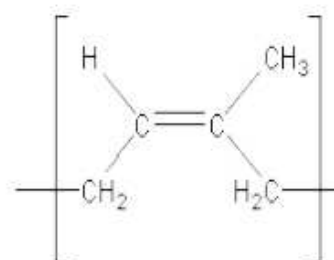
Em geral, os politerpenos consistem em mais de oito unidades de isopreno (superior a C-40). Estes terpenos são frequentemente encontrados em duas formas na borracha conforme está sendo apresentado na Figura 12 (MALECKY, 2005)

Charles Marie deu o nome de borracha, uma palavra francesa, da frase indiana "cao-chu" o que significa "madeira choro", que é um produto natural que flui a partir da casca de uma árvore. Ela é um líquido leitoso chamado látex. A borracha natural, extrato de *Hevea brasiliensis*, é um polímero de alto peso molecular cuja quantidade de isopreno é cerca de 140.000-210.000. Portanto, politerpenos são macromoléculas de peso molecular muito elevado, tendo o isopreno como padrão de base (AYAD, 2008).

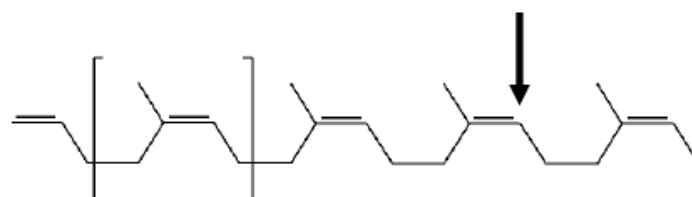
Figura 12 - Estrutura da borracha.



Hevea brasiliensis.



Padrão da borracha natural



Fonte: (PIRES, 2011).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA RELAÇÃO COM OS TERPENOS

Os óleos essenciais são o maior grupo de terpenos conhecidos no reino vegetal e animal.

3.4.1 Definição

O termo óleos essenciais deriva de "quinta essência", nome dado pelo médico suíço Paracelso, a extratos vegetais provenientes da destilação, isso significa que a fragrância é a essência da planta (KHENAKA, 2011). São componentes vegetais líquidos e altamente voláteis, marcados por ter cheiro forte e distinto, terpenos (principalmente monoterpenos) representam a maior parte (cerca de 90%) desses componentes (HAMDANI, 2012).

As maiorias dos componentes dos óleos essenciais estão incluídas em dois grupos: os terpenoides e fenilpropanoides, mas estes são menos frequente em comparação com terpenoides. Os óleos essenciais não contêm gorduras (lipídios) (KHENAKA, 2011; HAMDANI, 2012). São obtidos por destilação a vapor de água (RAKOTONANAHARY, 2012), sendo mais ou menos modificados durante a sua obtenção (FIGUEREDO, 2007).

3.4.2 Localização dos óleos essenciais nas plantas

Óleos essenciais são encontrados em plantas com sementes que inclui as famílias Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, etc. (RAKOTONANAHARY, 2012).

Eles podem ser armazenados em todas as partes da planta: flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes (FIGUEREDO, 2007).

3.4.3 Propriedades físico-químicas dos óleos essenciais

Sobre as propriedades físico-químicas, os óleos essenciais, formam um grupo muito homogêneo, o qual tem propriedades comuns representados no seguinte:

- Os óleos essenciais são, geralmente, líquidos à temperatura ambiente e

voláteis. Isto os diferencia a partir dos assim chamados óleos fixos.

- Eles são mais ou menos coloridos.
- Os óleos essenciais possuem fragrância característica.
- Sua densidade é geralmente menor do que a da água.
- O índice de refração e rotação óptica é elevado.
- Eles podem ser acionados por vapor, solúvel em álcool, éter e óleos fixos, mas insolúvel em água.
- Eles são modificáveis, sensíveis à oxidação e tendem a polimerizar, resultando na formação de produtos resinosos, sendo, então, necessário mantê-los longe da luz e do ar (RAKOTONANAHARY, 2012; LAIB, 2011).

3.4.4 Atividades biológicas dos óleos essenciais

O papel dos óleos essenciais na fisiologia da planta é ainda pouco conhecido. No entanto, os aromas emitidos desempenham papel atraente para insetos polinizadores. Os óleos essenciais têm propriedades antitóxica, antiviral e antiparasitária, sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica, alimentos e cosméticos. No entanto, os óleos podem ter muitos outros usos (LAIB, 2011).

3.4.5 Atividade antioxidante

O fenômeno de oxidação ocorre quando ao combinar um elemento com oxigênio, ele é transformado em um óxido. Os antioxidantes são moléculas que inibem as reações de radicais livres e retardam o dano celular. O poder antioxidante destes óleos essenciais foi desenvolvido como substituto na conservação de alimentos: foi demonstrado que a incorporação de óleos essenciais diretamente em carne, legumes picados e iogurte ou pulverizando em salsichas, frango, frutas inteiras e legumes, ajudando a preservá-los de oxidação (LAIB, 2011).

3.4.6 Atividade antimicrobiana

O modo de ação dos óleos essenciais depende, principalmente, do tipo e as características dos componentes ativos, em particular, a sua propriedade hidrofóbica que lhes permite penetrar a camada dupla de fosfolípido da membrana da célula

bacteriana. Isto pode induzir alterações conformacionais na membrana. Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à sua ação, em comparação com bactérias Gram-negativas (KHENAKA, 2011).

Óleos essenciais também podem inibir a síntese de DNA, RNA, proteínas e polissacáridos de bactérias (LAIB, 2011).

3.5 OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os óleos essenciais são líquidos concentrados de misturas complexas de compostos voláteis e podem ser extraídos de vários órgãos de plantas. Os óleos essenciais são fonte de vários compostos bioativos, que possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (TONGNUANCHAN, 2014). Muitos são os métodos de obtenção dos óleos essenciais, são eles: hidrodestilação arraste de vapor, extração por CO₂ supercrítico, extração assistida por micro-ondas entre outros. Neste trabalho foi utilizado o método de extração por solventes orgânicos.

3.5.1 Extração por solventes orgânicos

A técnica de extração por solvente consiste em colocar um solvente juntamente com o material da planta a ser tratado. Com lavagens sucessivas, o solvente será carregado com moléculas aromáticas, antes de ser enviado para o concentrador para ser destilado à pressão atmosférica. A extração por solvente orgânico volátil continua sendo o método mais praticado. Os solventes mais utilizados no presente são o hexano, ciclo-hexano, etanol, metanol, diclorometano e a acetona. O solvente escolhido, além de ser autorizado deverá possuir alguma estabilidade contra o calor, luz ou oxigênio, temperatura, o ponto de ebulição é baixo, a fim de facilitar a sua remoção, e que não devem reagir quimicamente com o extrato. Estes solventes têm um poder de extração mais elevado do que a água (SALLE, 2004).

3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é uma técnica de separação de moléculas na qual os componentes a serem separados entram em contato com duas fases dentro de uma

coluna de separação: fase estacionária, e outra, que é chamada de fase móvel. Os métodos cromatográficos permitem a determinação individual de cada componente. Dentro dos métodos cromatográficos que se utilizam com mais frequência está a CLAE, utilizado neste estudo (Figura 13) (CHIAVARI, 2004).

A CLAE pode ser dividida em dois grupos principais, a CLAE-FN (fase normal) e a CLAE-FR (fase reversa) que ocorre pela composição da FE (fase estacionária) que proporciona a coluna característica hidrofóbica (CLEMENTINO, 2014). Hoje, a CLAE-FR é a técnica analítica mais popular para separar misturas complexas na indústria química, farmacêutica e biotecnológica. A CLAE-FR é o oposto da cromatografia de fase normal, com uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar. As fases estacionárias mais comuns utilizadas são as fases octadecildimetil (C18) com sílica como suporte sólido. Na cromatografia de fase reversa, os solutos são separados utilizando a sua hidrofobicidade. Um soluto mais hidrofóbico será retido na coluna por mais tempo do que um menos hidrofóbico. A fase móvel é um dos dois componentes envolvidos no processo de separação (SHABIR, 2010).

Figura 13 – Cromatógrafo Perkin-Elmer.



Fonte: Perkin-Elmer, 2017.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEB), suas coordenadas geográficas de latitude e longitude são: -7.660452455692277 e -36.893180150389135, respectivamente, localizado no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande, em Sumé – Paraíba.

Figura 14 - Localização aérea do CDSA.



Fonte: GOOGLE MAPS, 2017.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi a resina retirada da *A. lebbeck*. O resíduo foi obtido por meio da extração manual do exsudato exposto no tronco da árvore, localizada no CDSA (área destacada da Figura 14), Sumé, Paraíba.

O fluxograma da Figura 16 mostra a sequência de etapas que envolveram a preparação da resina até a realização dos testes de atividade antimicrobiana e antioxidante, após a purificação do mesmo.

Figura 16 – Fluxograma de preparação da resina de *A. lebbeck*.



Fonte: Autor, 2017.

4.2.1 Moagem da resina vegetal no moinho de facas

O objetivo desse tipo de moinho é fracionar o material desejado, nesse caso, a resina proveniente da *A. lebbeck*. O pó produzido foi coletado e armazenado em frascos hermeticamente fechados até o momento do uso, como mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Resina moída e armazenada em frascos hermeticamente fechados.



Fonte: Autor, 2016.

O extrato obtido após o tratamento com solventes orgânicos foi congelado em ultrafreezer a -70°C por 48h. Após o congelamento em tubos de 50 mL, o extrato foi liofilizado várias vezes até que todo o material pudesse ser concentrado em um recipiente de 1mL. O equipamento utilizado para a liofilização foi um liofilizador (modelo K 105, marca Liotop).

4.2.2 Extração por solventes

A resina proveniente da *A. lebbeck*, foi submetida à extração na proporção de 1mL de Metanol Pa por grama da resina, agitado em temperatura de 35°C , durante 48 horas. Em seguida, o extrato foi submetido à extração com Hexano Pa na proporção de 10% do valor de metanol que foi adicionado, o qual foi levado ao agitador, a 35°C , no período de 48 horas. Posteriormente, o extrato total (Hexânico e Metanólico) foi armazenado em tubos e levados ao ultrafreezer, a -70°C .

4.2.3 Liofilização

Após a extração por solventes, as amostras obtidas foram levadas ao liofilizador (modelo K 105, marca Liotop, São Carlos-SP, Brasil), em uma temperatura de -90°C durante 24h ou até que todo o líquido fosse totalmente sublimado. Em seguida, todo o liofilizado foi ressuspensionado com água destilada e levado ao liofilizador, novamente sob as mesmas condições citadas anteriormente, a fim de concentrar ao máximo as amostras.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de Fase Reversa (CLAE-FR), foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido CDSA –UFCG.

Para purificação das amostras provenientes dos extratos metanólico foi utilizado uma Coluna C18 (150 mm X 4,6mm, com partícula de 5 μm) ShimPack – Shimadzu, em um cromatógrafo Perkin-Elmer, no Laboratório de Biotecnologia do

CDSA. Foi programado um gradiente de água deionizada (Tampão A) e Acetonitrila (Tampão D), a um fluxo de 1mL/min, onde foi passado o Volume de Coluna (5 min) em 0% de acetonitrila, seguido de um gradiente de 0% a 100%, em 25 min, seguido de uma lavagem da coluna com 100% de acetonitrila por 5min. O cromatograma gerado, com o detector ajustado em 280 nm, foi registrado em um microcomputador interligado ao cromatógrafo.

Após ajuste da técnica para separação dos picos cromatográficos, a coleta do material purificado foi realizada manualmente, com a coleta diferencial do solvente eluído da coluna, nos tempos de retenção referentes às áreas de interesse.

O material coletado foi separado em recipientes devidamente esterilizados e identificados até a sua utilização nos testes de atividade antimicrobiana e antioxidante.

4.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de antibiograma é comumente utilizado para identificar compostos com ação antimicrobiana. Para a realização do teste foi preparado o meio de cultura ágar-dextrose-caseína-malte (ACDM). Para o preparo dos discos os quais continham os metabólitos secundários purificados a serem testado como antibiótico, foram utilizados 20µL da solução de cada composto, em discos de papel de filtro, os quais foram posicionados sobre a placa contendo os microrganismos em crescimento. Posteriormente, as placas serão identificadas e incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand), a 37°C, por 8h, segundo a metodologia descrita por Clementino (2014).

4.4.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos teste antibiograma, realizado de acordo com Clementino (2014), foi o ADCM, conforme discriminado na Tabela 1:

Tabela 1 – Composição do meio de cultura Ágar, Dextrose, Caseína e Malte (ADCM).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar caseína	32,5 g
Dextrose	20 g
Extrato de malte	10 g
Água Destilada Esterilizada	q.s.p.* 1 L

(*) q.s.p.= quantidade suficiente para. Fonte: Dados da Pesquisa.

O meio foi fundido, o pH ajustado com NaOH 0,1 N para $7,0 \pm 0,1$, distribuído em *Erlenmeyers* (250 mL) e tudo foi autoclavado por 15 minutos, a 121°C , 1 atm, em seguida vertido cerca de 20 mL em placas de Petri.

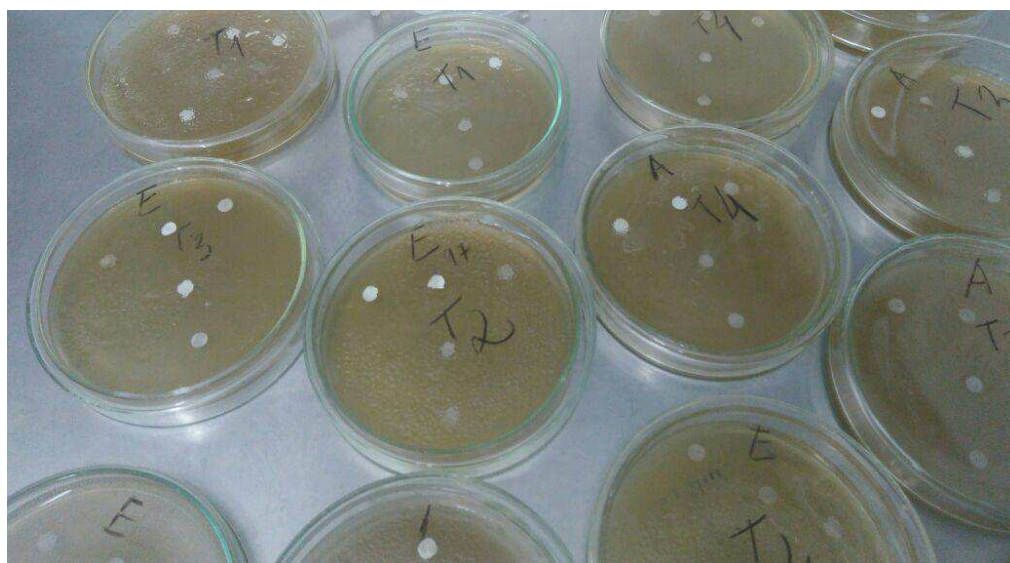
4.4.2 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel foram preparados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (1988) e Clementino (2014), com algumas adaptações. Foi adicionado em cada disco de papel de filtro de 13 mm, 20 μL do extrato obtido, esperando a absorção e repetindo o processo novamente. A fim de comparar o potencial antibacteriano dos metabólitos presentes no extrato, foram preparados discos contendo cloranfenicol na concentração de 100mg/mL, como controle positivo e discos contendo apenas clorofórmio PA (99,8%), como controle negativo.

4.4.3 Preparo do inóculo bacteriano

Foi retirada com uma alça de platina, previamente flambada, uma pequena quantidade de bactérias, estas foram inseridas em solução salina (0,9%) e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas por meio de uma diluição seriada na ordem de 10^{-6} . Inoculou em meio ADCM todas as diluições e incubou em estufa de cultura bacteriológica modelo SX-DTMC, fabricante Prolab, a 37°C para contagem resultando em 9×10^5 UFC/mL, que foi utilizada nos testes antibiograma (Figura 17) (CLEMENTINO, 2014).

Figura 17 - Placas de Petri com meio ADCM contendo *S. aureus* e *E. coli*.



Fonte: Autor, 2017.

4.4.4 Teste antibiograma

O teste realizado foi baseado em Clementino (2014). Foi semeado 1 mL da solução de bactérias (9×10^5 UFC) em placas de Petri contendo meio ADCM aguardando secar, conseguinte os discos contendo o extrato obtido foram dispersos sobre as bactérias com o auxílio de uma pinça. As placas foram identificadas e incubadas em câmara BOD modelo CE-300/350, a 37°C, por 12 horas.

4.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade do consumo de radicais livres do extrato foi medida em termos de trocas de hidrogênio, utilizando radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma) (DAVIES, 2000). A determinação da atividade de eliminação de radicais DPPH foi estimada usando o método utilizado por Jain (2008), com algumas adaptações.

Cada analito (0,05mL) foi misturado com 0,95mL de solução 0,1 mM recentemente preparada de radical DPPH em metanol, exceto nos brancos, onde foi adicionado apenas o solvente. A reação foi realizada a 37 °C, na ausência de luz,

após 20 minutos procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 517 nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação.

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{\text{Abs.contr.negativo} - \text{Abs.amostra}}{\text{Abs.contr.negativo}} \times 100$$

Em que:

Abs. contr. negativo = Absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

Abs. amostra = Absorbância da amostra com o DPPH.

4.5.1 Curva do DPPH

A atividade antioxidante foi expressa como equivalentes de ácido ascórbico por g de peso seco, utilizando uma curva de calibração, construída em 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mM de ácido ascórbico dissolvido em metanol. Cada analito (0,15 mL) foi misturado com 2,85 mL de solução 0,1 mM recentemente preparada de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma) em metanol. A reação foi realizada a 37 ° C no escuro e a absorbância a 517 nm foi registada após 15 min contra metanol.

4.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA

O extrato foi testado quanto a presença de compostos bioativos utilizando os métodos descritos por Kokate (2009), com adaptações.

4.6.1 Teste para identificação de Esteroides

O extrato bruto testado foi misturado com 1 mL de clorofórmio e H₂SO₄ concentrado foi adicionado lateralmente. Uma cor vermelha produzida na parte inferior do clorofórmio indicou a presença de esteroides.

4.6.2 Teste para identificação de Alcaloides

Usou-se cerca de 500 μL de extrato vegetal purificado foram dissolvidos em 1 mL metanol e depois filtrado. Adicionou-se 500 μL do Reagente de Erdmann (1mL de HNO_3 diluído em 60 mL de H_2SO_4 concentrado). A cor de laranja indica a presença de alcaloides.

4.6.3 Teste para identificação de Terpenoides

O extrato purificado (500 μL) foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio e evaporou-se à secura. Após isso, adicionou-se 1 mL de H_2SO_4 concentrado aquecendo por cerca de 2 min. Uma cor acinzentada indica a presença de terpenoides.

4.6.4 Teste para identificação de Saponinas

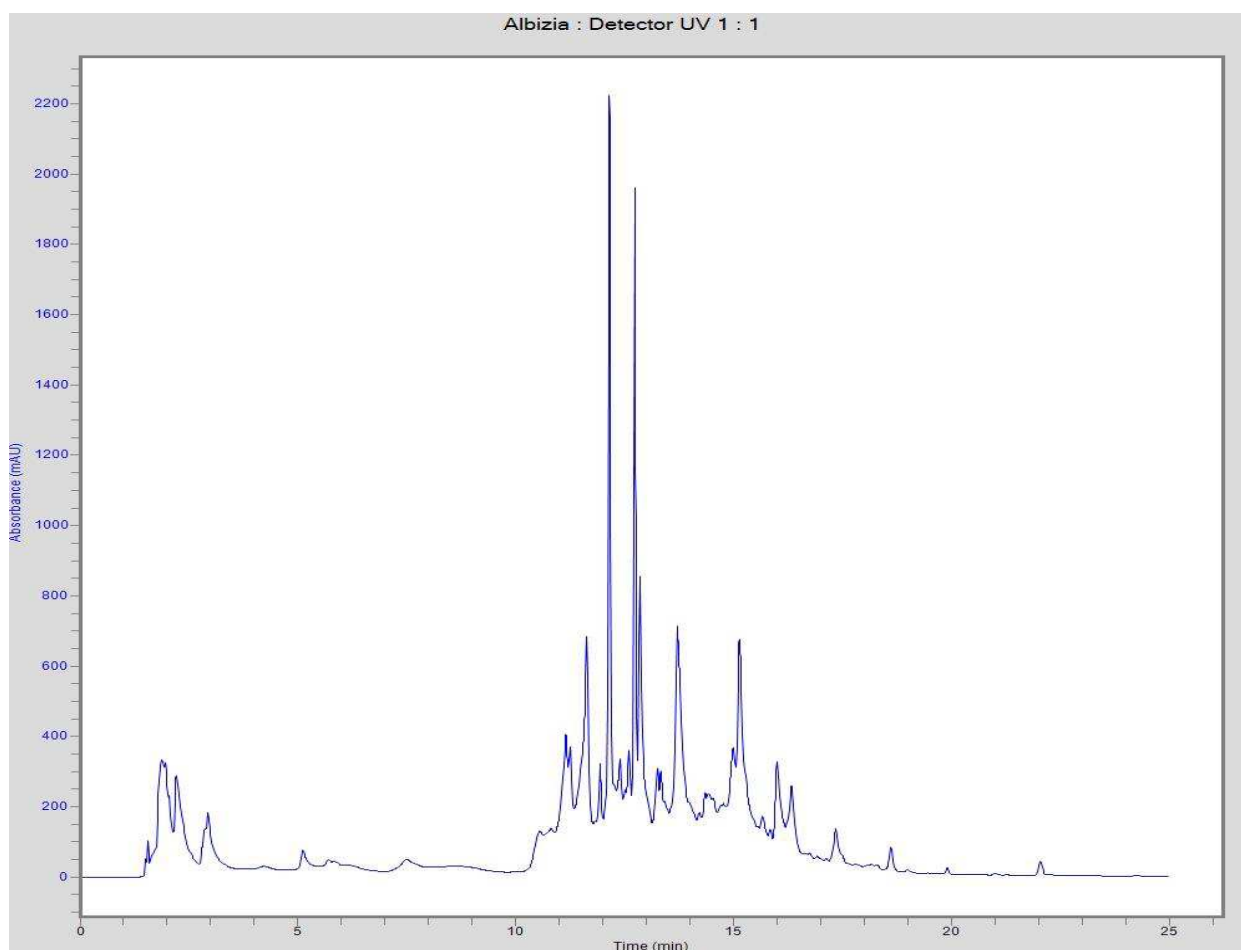
Adicionou 1 mL do extrato, que foram misturados com 4 ml de água destilada e depois agitados em um cilindro graduado durante 15 min. A formação de espuma indica a presença de saponinas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS CONTIDOS NOS EXTRATOS

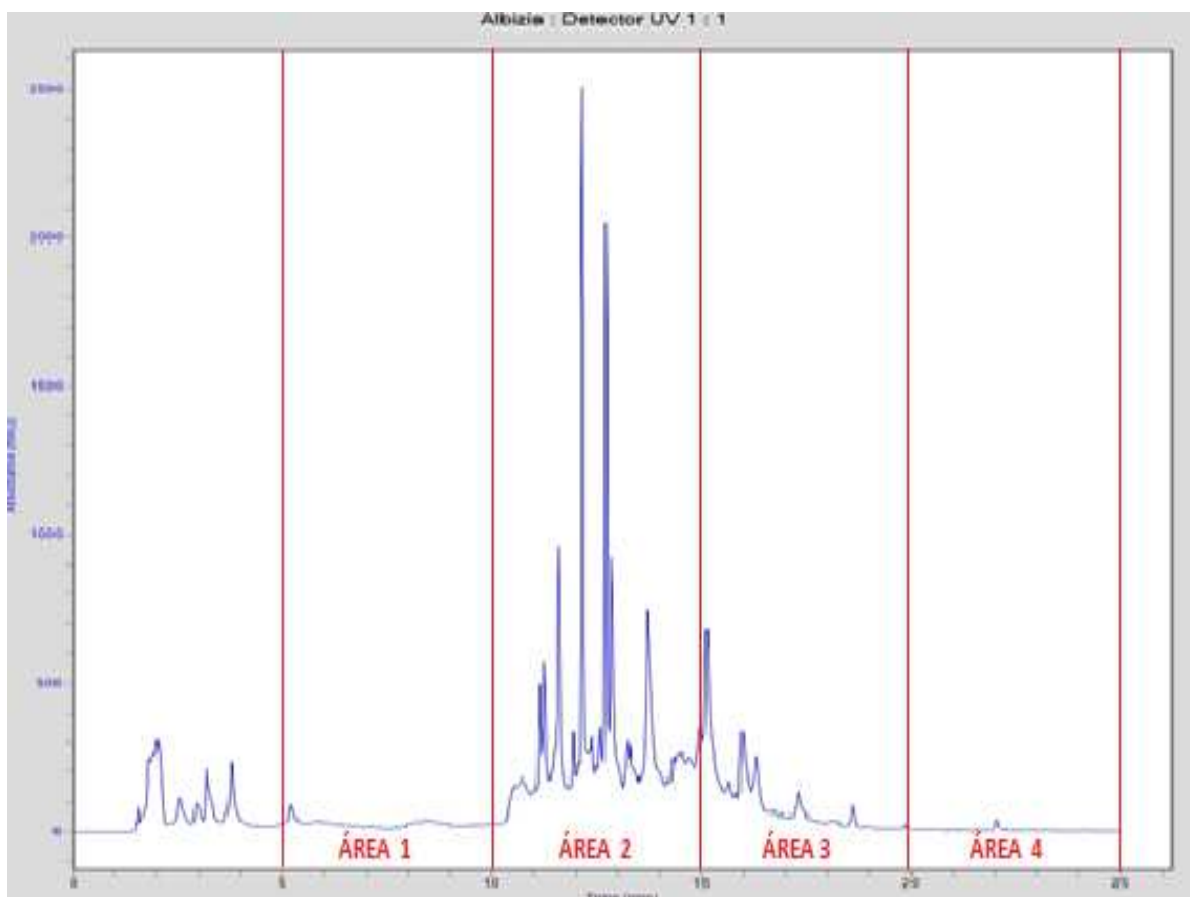
O resultado da CLAE mostrou que o composto obtido das frações separadas em função do tempo do extrato de *A. lebeck* revelou aproximadamente vinte picos, entre 10 e 20 min, ou seja, que podem ser 20 possíveis compostos diferentes responsáveis por sua atividade antioxidante e antibacteriana, como mostram os cromatogramas das Figuras 18 e 19.

Gráfico 1 - Cromatograma gerado a partir da corrida dos extratos provenientes da resina da *A. lebeck*.



Fonte: Autor, 2017

Gráfico 2 - Cromatograma dos extratos provenientes da resina da *A. lebeck* dividido em suas respectivas áreas purificadas



Fonte: Autor, 2017

As Figuras 18 e 19 dos extratos purificados possuem alta similaridade, em que ambos apresentam atividade contra as duas cepas bacterianas e atividade antioxidante testadas neste trabalho. Foram testadas para ambas as atividades áreas de coleta no período de 5 a 10 min, 10 a 15 min, 15 a 20 min e 20 a 25 min do cromatograma.

Após a purificação conseguiu-se testar os analitos obtidos e três deles foram favoráveis à inibição parcial do crescimento bacteriano em diferentes linhagens, gerando halos de inibição. Entretanto, os Picos de 15 a 20 min, correspondente a Área 2 do cromatograma, apresentaram maiores halos em relação aos outros e foi o único a apresentar atividade antioxidante.

As Áreas 1, 3 e 4 não apresentaram atividade antibacteriana igual ou superior ao apresentado pela Área 2. Isso significa dizer que ou o efeito sinérgico dos metabólitos secundários pode apresentar maior efeito, ou a quantidade de compostos isolados não é a suficiente para causar efeito semelhante à Área 2.

5.2 ANTIBIOGRAMA

O extrato de metanol e hexano foram testados quanto à atividade antibacteriana a partir de sua purificação, sendo divididos em diferentes áreas do cromatograma, descrito anteriormente. Os resultados do presente estudo demonstraram que o extrato metanólico e hexânico de *A. lebeck* conferem atividades antibacterianas que inibiam o crescimento das bactérias teste com diferentes zonas de inibição (Tabela 2), para efeito antibacteriano contra a estirpe bacteriana Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*), adquiridas da coleção ATCC® 25923™ e ATCC® 25922™, respectivamente.

Quando comparado com o antibacteriano Cloranfenicol, verificou-se que o extrato de metanol e hexano da resina de *A. lebeck* mostra maior halo de inibição contra *S. aureus*. No entanto, verificou-se que exibem atividade moderada contra *E. coli*, que podem ser averiguados na Tabela 2. Além disso, observou-se que a atividade antimicrobiana do antibiótico foi maior contra a bactéria Gram-negativa em comparação com a Gram-positiva (ABRIHAM, 2015).

TABELA 2 - Ação antibacteriana dos extratos purificados

ANALITO PURIFICADO	LINHAGENS BACTERIANAS	
	<i>Escherichia Coli</i> (ATCC 25922) – (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) – (mm)
ÁREA1	0,33	1
ÁREA2	0,33	1,5
ÁREA3	1,16	0
ÁREA4	0	0,33

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

Bactérias Gram-negativa possuem membrana externa, diferente das bactérias Gram-positivas na qual essa membrana se mostra ausente (ZAIKA, 1988). Em bactérias Gram-negativas, a superfície da membrana extra é rica em lipopolissacarídeos, proporcionando barreira contra antibióticos e são capazes de eliminar moléculas em seu exterior (NIKAIDO, 1996; DUFFY, 2001). Bactérias Gram-positivas não têm membrana protetora e parede celular. As substâncias antibacterianas causam a destruição da membrana e decorrente coagulação (RUSSELL, 1991; NIKAIDO, 1994; GAO, 1999).

A atividade antibacteriana das diferentes partes da *A. lebbeck* foi mencionada em diferentes trabalhos (SHAHID, 2012; BOBBY, 2012). Estudos comprovaram a presença de alcaloides, saponinas, flavonoides e taninos em extrato de metanol de *A. lebbeck* (PADAMANABHAN, 2013). No entanto, os terpenoides foram encontrados em diferentes partes da planta por Roberts (2007). Diversos estudos encontrados mostram que os metabolitos secundários encontrados nos óleos essenciais purificados de plantas possuem atividade antibacteriana.

Extrato aquoso de *Tamarindus indica* (Fabaceae) foi testado contra atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Estudos fitoquímicos do extrato revelou que os principais constituintes encontrados em maiores concentrações foram alcaloides (ABUKAKAR et al., 2008). Além disso, a partir de mesma análise foi revelado que os extratos de metanol que tinha um potencial de atividade antibacteriana, alcaloides estavam presentes em elevadas concentrações (MARIITA, 2011).

Em estudo semelhante, o extrato de metanol de *S. multiflorus* exibiu atividade contra *S. aureus*, após análise fitoquímica, verificou-se que este extrato metanólico apresentava elevadas concentrações de flavonoides. Portanto, estes flavonoides contribuem para diferentes atividades antibacterianas (MARIITA, 2011).

Aspilia mossambicensis (Compositae) foi examinada para atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistente à metilicina e o extrato etanólico apresentou altas concentrações de terpenoides. Estes metabolitos secundários, juntamente com outros fitoquímicos poderiam estar envolvidos na atividade antibacteriana (MUNYENDO, 2011).

Os taninos podem ter diferentes atividades biológicas, incluindo antibacteriano (RAMAWAT 2007; CARSON 2010; SAVOIA 2012). Analisando a atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Psidium guajava* (Myrtaceae) obteve atividade

contra *S. aureus* e *E. coli*. Uma análise fitoquímica comprovaram altas concentrações de taninos (ABDULHAMID, 2014).

Os picos encontrados na purificação da resina exsudada de *A. lebecck*, que se encontra em Sumé, situada no Cariri Paraibano, indicando a presença de diversos compostos e os inúmeros trabalhos mencionados, corroboram a eficácia da planta no teste realizado.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ensaio DPPH é um dos métodos simples e de remoção de radicais. A remoção de DPPH por antioxidantes é devido ao seu hidrogênio, doação de elétrons. Em solução metanólica, o DPPH apresenta absorção a 517 nm. Quando o elétron se emparelha na presença de um analito antioxidante a solução de DPPH descolore-se, a cor muda de violeta escuro para amarelo (Figura 20). A coloração da solução indica a eliminação de radicais das substâncias (SUDHARSHAN, 2010; NAIK, 2015).

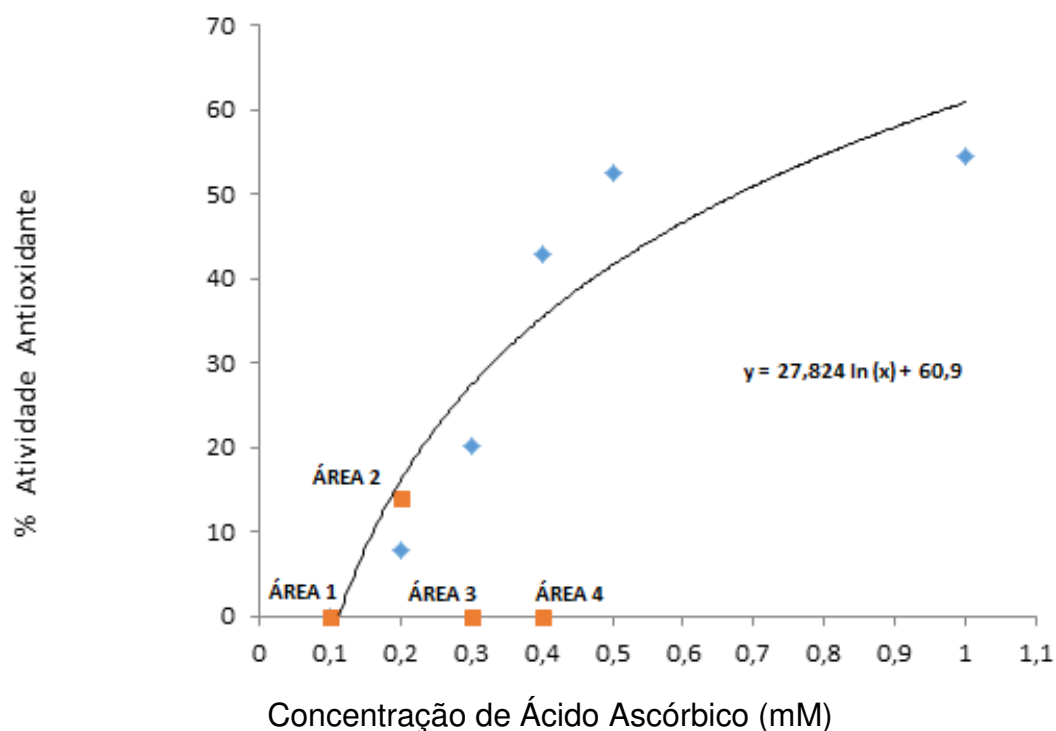
A determinação de conteúdo total de fenólicos e flavonoides a partir de extratos de ervas é considerada necessária para estudar o potencial das plantas para a prevenção de doenças e é o primeiro passo na determinação da atividade antioxidante (TOSUN, 2009). No presente estudo, o extrato da resina exsudada de *A. lebbeck*, que foi purificada, mostrou atividade de eliminação de radicais em apenas uma área do cromatograma, referente ao período de 10 a 15 min, onde podemos visualizar nas figuras 20 e 21.

Figura 18 - Extrato da resina exsudada purificado em quatro diferentes áreas após o teste de atividade antioxidante



Fonte: Autor, 2017

Gráfico 3 - Eliminação de radicais DPPH por diferentes áreas da resina exsudata purificada de *A. lebbeck* (laranja) em comparação com a eliminação de radicais DPPH do Ácido Ascórbico (azul).



O valor de atividade antioxidante do extrato mostrado na figura 21 foi de 13,78 %, o equivalente a 0,25mM de ácido ascórbico utilizado como padrão, através da equação da reta presente na figura mostrada anteriormente. Yutana (2009) utilizou o etanol para extrair o extrato a partir da casca de caule de *A. lebbeck*. O seu extrato mostrou atividade antioxidante no método de eliminação de DPPH, quando comparado com o ácido ascórbico. Eles também descreveram que esta planta é usada para longevidade na Tailândia. Logo, a *Albizia lebbeck* encontrada no CDSA também pode ser utilizada como promotor da longevidade.

Diferentes estudos também indicaram o efeito antioxidante in vitro atividade de diferentes partes de *A. lebbeck* (ZIA-UI-HAQ et al., 2013). Tiwari (2011) declarou que serão obtidos vários compostos ativos se o metanol for utilizado como solvente na técnica de extração, isto é, antocianinas, saponinas, taninos, flavonas e polifenóis. A atividade antioxidante do extrato pode estar associada com a presença de compostos fenólicos (BRACA et al., 2002; DEMIRAY et al., 2009; RAKESH et al., 2013).

Zia-UI-Haq (2013) investigou a composição e avaliaram a atividade antioxidante das vagens e sementes, raízes e caules de *A. lebbeck*. Os ensaios antioxidantes in vitro, tais como o poder antioxidante reduzido férrico, o parâmetro antioxidante de captura radical total e a capacidade antioxidante equivalente, mostraram que os extratos hidroalcoólicos examinados têm potencial antioxidante.

5.4 METABÓLITOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A detecção de alcaloides, terpenoides e esteroides no extrato indica que estes são alguns dos possíveis metabolitos secundários encontrados no extrato de *A. lebbeck*, uma vez que em nossos estudos encontramos 20 substâncias, ou seja, temos para cada pico um composto diferente. Estes compostos da Tabela 3 são conhecidos por exibirem propriedades bioativas como propriedades analgésicas e anticancerígenas (Ali et al., 2008). Assim, estes metabolitos secundários contribuem para o uso potente em indústrias farmacológicas.

Tabela 3 - Análise fitoquímica qualitativa do extrato da resina exsudada de *Albizia lebbeck*

FITOQUÍMICOS	INFERÊNCIA
Terpenoides	≠
Alcaloides	+
Esteroides	+
Saponinas	--

≠ : Significa que com a metodologia utilizada não foi possível a visualização do resultado.

+ : Indica presença.

-- : Indica ausência.

Segundo a metodologia de Kokate (2009) para o teste de esteroides, uma cor vermelha produzida na camada inferior do clorofórmio indica a presença de esteroides. Uma leve coloração avermelhada na interface do clorofórmio na Figura 22 indica a presença de esteroides.

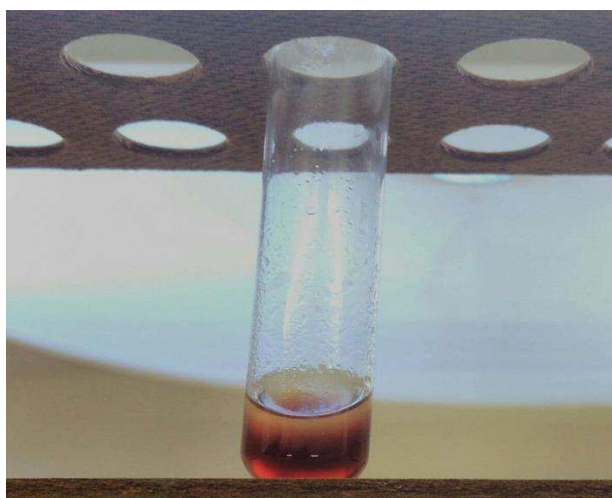
Figura 19 - Resultado do teste fitoquímico para esteroides



Fonte: Autor, 2017.

Testes fitoquímicos de diferentes espécies pertencentes ao gênero *A. lebeck* identificou diferentes classes de metabólitos secundários tais como saponinas, terpenos, alcaloides e flavonoides. Alcaloides apresentaram atividades biológicas, como antitumoral e atividade bactericidas GANGULI (1993). Estudos preliminares sobre *A. inopinata* indicaram possível farmacológica sobre o sistema nervoso central devido à presença de alcaloides (ASSIS et al., 1999).

Figura 20 - Solução de Erdmann reagindo com o extrato exsudato purificado de *A. lebecck*.



FONTE: Autor, 2017.

Existem vários reagentes colorimétricos para a identificação qualitativa de alcaloides, um deles é o Reagente de Erdmann, que reage com o analito de interesse produzindo uma cor característica para cada tipo de alcaloide presente na amostra, que pode ser vista na Figura 23. Esta solução reage gerando substâncias coloridas de acordo com a seguinte relação:

Tabela 4 – Relação entre alcaloides e indicadores de cor.

Morfina	Avermelhado
Brucina	Vermelho que passa a amarelo
Tebaína	Vermelho sangue
Digitalina	Marrom que passa a vermelho
Papaverina	Violeta

Fonte: Manual de Soluções, Reagentes e Solventes 2ª Edição.

Na triagem fitoquímica realizada por Kalia (2015) revelou a presença de alcaloides, flavonoides, fenóis, saponinas, terpenos e fitoesteróis em *A. lebeck*, utilizando extração etanólica e concentração em evaporador rotativo. A maneira com que chegamos ao nosso analito pode ter alterado o desenvolvimento de tal análise.

A investigação fitoquímica de diferentes espécies de *Albizia* revelou a presença de diferentes classes de metabólitos secundários, tais como saponinas, terpenos, alcaloides e flavonoides (CHEOK, 2014).

Figura 21 - Resultado da análise fitoquímica para terpenoides.



Fonte: Autor, 2017.

O extrato foi testado para a presença de terpenoides. Uma cor acinzentada deve indicar a presença de terpenoides, no entanto, não foi possível a análise. Um segundo teste foi realizado com concentração do extrato muito inferior a utilizada e também não se obteve resultado conclusivo, como é mostrado na Figura 23. A metodologia utilizada é realizada com extrato bruto na presença de clorofórmio. O analito testado nesse trabalho foi extraído com metanol, hexano e foi tratado, por fim, com clorofórmio para a realização da análise fitoquímica de terpenoides.

No teste fitoquímico para saponinas, não foi possível identificar a presença de saponinas.

A metodologia de purificação e concentração dos metabólitos do extrato pode ter influenciado no resultado final.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos pode-se concluir:

- O extrato estudado possui potencial para ser utilizado para o desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente por apresentar atividades antioxidante e antibacteriana.
- A atividade antioxidante foi obtida na Área 2 do cromatograma, que detêm aproximadamente 20 substâncias.
- O extrato estudado foi capaz de inibir o crescimento das estirpes bactérias testadas, tendo melhor resposta em bactérias Gram - positiva. As Áreas 1 e 2 apresentaram atividade contra bactérias Gram-positiva e negativa. Já a Área 3 apresentou considerável atividade contra a bactéria Gram-negativa utilizada.
- A partir de testes fitoquímicos, foi possível identificar a presença de alcaloides e esteroides.

REFERÊNCIAS

- ABDULHAMID A., et al., **Preliminary phytochemical and antibacterial activity of ethanolic and aqueous stem bark extracts of *Psidium guajava***. Am. J. Drug Discovery Dev., 2014.
- ABUKAKAR et al., **Phytochemical screening and antibacterial activity of *Tamarindus indica* pulp extract**. Asian J. Biochem, 2008.
- ABREU-TARAZI, et al. **Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE**. World J Microbiol Biotechnol, 2010.
- ABRIHAM, H., PAULOS, B. **In vitro Antioxidant and Antibacterial activity of *Albizia lebbeck* (L) Benth Stem Bark**. Science, Technology and Art Journal Research, 2015.
- ALI, S. ***Albizia lebbeck* (L) Benth**: Flora of Pakistan Vol. 36 University of Karachi, Karachi, 1973.
- AYAD, H.S., et al. **Efficiency of Stigmasterol and α - Tocopherol Application on Vegetative Growth, Essential Oil Pattern, Protein, and Lipid Peroxidation of *Geranium* (*Pelargonium Graveolens* L.)**. Journal of Applied Sciences Research, 2008.
- ASSIS TS et al. **Two New Macrocyclic Alkaloids from *Albizia inopinata***. Lat Am J Pharm 1999.
- ATTI-SANTOS et al. **Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) from South Brazil**. Perfumer and Flavorist, 2000.
- BARUAH, P.P. et al. **Immunomodulatory effect of *Albizzia Lebbeck***. Pharmaceutical Biology, 2000.
- BELBACHE H. **Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora* Desf** . mémoire de magister en chimie organique. Université Mentouri Costantine, 2003.
- BENAISSA, M. et al. **In Vivo Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Activities of Moroccan Medicinal Plants**. Natural Product Communications, 2011.
- BOBBY, M.N. et al. **In vitro antibacterial activity of leaves extracts of *Albizia lebbeck* Benth against some selected pathogens**. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012.
- BRACA, A. et al., Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002.
- CARSON, C.F. HAMMER K. A. **Chemistry and Bioactivity of Essential Oils**. In: Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. New Youk, USA., 2010.
- CHEMAT F., et al. **Essential oils as antioxidants**. Int. J. Essent. Oil Therapeut. Vol. 1, 2007.

- CHEOK C, et al. **Extraction and quantification of saponins: A review.** Food Research International, 2014.
- CHIAVARI G, et al. **Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of natural resin used for artistic objects.** Chromatographia, 2004.
- CHINTAWAR SD, et al. **Nootropic activity of Albizzia lebeck in mice.** J Ethnopharmacol, 2002.
- CLEMENTINO, Leandro da Costa. **Bioprospecção de Antibióticos Produzidos por Fungos da Caatinga.** 2014. 52 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande. 2014.
- COMPANT, S., et al. **Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization.** Soil Biology and Biochemistry, v. 42, 2010.
- COOK, B. G., et al. **Tropical forages.** Brisbane, Australia, 2005.
- CRAVOTTO G., et al. **Improved extraction of vegetable oils under high intensity ultrasound and/or microwaves.** Ultrason Sonochem, 2008.
- CROTEAU R, et al. **Natural products (secondary metabolites) in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.*** (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD), 2000.
- DAVIES, K. J. A. **Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems.** IUBMB Life 50:279-289, 2000.
- DEMIRAY, S. et al., **Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: Tilia argentea, Crataegi folium leaves and Polygonum bistorta roots.** International Scholarly and Scientific Research & Innovation, 2009.
- DOUGHARI, J.H. **Antimicrobial Activity of Tamarindus indica Linn.** Trop. J. Pharm. Res, 2006.
- DUDEJA S.S., et al. **Interaction of endophytic microbes with legumes.** J Basic Microbiol, 2012.
- DUFFY CF, Power RF. **Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts.** Int J Antimicrob Agents, 2001.
- FEITOSA, P.L.R; CUNHA J.P.A., **Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico.** Química Nova, 2009.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ALMEIDA, V.P. **Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nudicaule* Benth.** Revista Brasileira de Botânica, v.9, n.1, p.75-80, 2007.
- FLAMINI G., et al. Main Agronomic – **Productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils.** J. Agric. Food Chem., Vol. 50, pp : 3512–3517, 2002.
- FLEURETIN J., et al. **Ethnopharmacologie. Sources, méthodes, objectifs.** In: Revue d'histoire de la pharmacie, 81^e année, n°297, 1993.

- GANGULI, N B, BHATT, R M. Indian .**J. Exp Biol.** 1993.
- GAO Y., et al. **The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C.** Appl Environ Microbiol, 1999.
- GILDEMEISTER E.; HOFFMANN FR. **Les huiles essentielles.** 2^{ème} Edition. Edition Schimmel & Cie, Miltitz près Leipzig, 1912.
- GOMES, S. M. C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica.** Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade e Ambiente) - Universidade de Coimbra, Portugal, 2010.
- GOOGLE MAPS. [**Localização aérea do CDSA**]. [2017]. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Centro+de+Desenvolvimento+Sustent%C3%A1vel+do+Semi%C3%A1rido/@7.6629217,36.8937145,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x7ac1e2c04601539:0x4f1cf8ed3ada3d0d!8m2!3d-7.6629217!4d-36.8915258>>. Acesso em: 30 de Janeiro de 2017.
- GUPTA R. S., et al. **Effect of Saponins of *Albizia lebeck* (L.) Benth bark on the reproductive system of male albino rats,** Journal of Ethnopharmacology. 2005.
- HAMDANI M; TABASSUM N. **Plants used to treat skin diseases.** Pharmacogn. Rev. 8, 2012.
- HEDBERG, I., STAUGARD, F., **Traditional Medicinal Plants.** Traditional Medicine in Botswana. Ipeleng Publishers, Gaborone. 1989.
- HOVANEISSIAN M., et al. **Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin.** Comptes Rendus Chimie, 2006.
- HUSSAIN, A.I., et al. **Chemical composition. Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations.** Food Chemistry, 108: 986-995, 2008.
- KALIA, S. et al. **Antimalarial Efficacy of Albizia Lebbeck (Leguminosae) against Plasmodium Falciparum in Vitro & P. Berghei in Vivo.** The Indian Journal of Medical Research, 2015.
- KANG J., et al. **New Ceramides from the Flower of Albizia julibrissin.** Chinese Chemical Letters. 2007.
- KASTURE VS., et al. **Anticonvulsive activity of *Butea monosperma* flowers in laboratory animals.** Pharmacol Biochem Behav, 2002.
- KOKATE CK., et al. **Pharmacognosy.** Nirali Prakashan. 2009.
- JAIN, A., et al. **Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. leaves.** J. Ethnopharmacol, 2008
- KELLY K. [**History of medicine**]. [2009]. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/26657174/The-History-of-Medicine-2009>. Acesso em:15 de junho de 2017.
- KHENAKA, K. **Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin,** Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. p19, 24, 2011.

KOKILA K., et al. **Phytopharmacological properties of albizia species: a review.** Int J Pharm Pharm Sci. 2013.

LAIB I. **Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle extraite des fleurs sèches de Lavandula officinalis.** Mémoire de Magister, INATAA, Université de Constantine pp. 21-69,2011.

LAMBERT, J.B; POINAR, G.O. Jr. **Amber: the organic gemstone.** Acc. Chem. Res. 2003.

LANGENHEIM J. H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany.** Portland, Cambridge: Timber Press, 2003.

MAJI, S., et al. **Invitro Antimicrobial Potentials of Different Solvent Extract of Ethnomedicinal Plants against Clinically Isolated Human Pathogens.** Journal of Phytology, 2010.

MALECKY, M.; BROUDISCOU, L.P. **Dissappearance of nine monoterpenes exposed in vitro to the rumen microflora of dairy goats: effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin.** Journal of Animal Science, Champaign, v. 87, n. 4, 2005.

MARIITA RM. Et al., **Methanol extracts of three medicinal plants from Samburu in northern Kenya show significant antimycobacterial, antibacterial and antifungal properties.** Res. J. Med. Plant, 2011.

MCCASKILL D.; CROTEAU R. **Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants.** Trends Biotech. 1998.

MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos.** São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MUNYENDO et al., **Bacteriostatic and bacteriocidal activities of *Aspilia mossambicensis*, *Ocimum gratissimum* and *Toddolia asiatica* extracts on selected pathogenic bacteria** Research Journal of Medicinal Plants, 2011.

NAIK, A.S., ET AL., **Antimicrobial and radical scavenging efficacy of leaf and flower of *Aristolochia indica* Linn.** Science, Technology and Arts Research Journal, 2015.

NATURAL HEALTHY CONCEPTS [**Remédios com extrato de Albizia**]. Disponível em: < www.naturalhealthyconcepts.com >. Acesso em 31 de janeiro de 2017.

NIKAIDO H.. et al. ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology.** In: Neidhardt FC, editor. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press; 1996.

OLEOS ESSENCIAIS. [**Extração de óleo essencial pelo método da hidrodestilação**]. Disponível em: < <http://oleosessenciais.org> >. Acesso em 01 de Fevereiro de 2017.

ORWA C., et al. **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide,** 2009.

- PADAMANABHAN V. et al., **Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on flowers and pods of Albizia lebbeck** (Benth). International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, 2013.
- PHILLIPSON, J. D. **50 years of medicinal plant research** – every progress in methodology is a progress in Science. *Planta Medica* 69, 491-495. 2003.
- PIRES, J. M., et al. **Taxonomia e fitogeografia das seringueiras (Hevea spp.)**. Embrapa Amazônia Oriental, 2011.
- RAKESH, K.N. et al., **Antibacterial and antioxidant activity of Fahrenheitia zeylanica (Thw.)** Airy. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 2013.
- RAKOTONANAHARY M. **Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie** diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28. 2012.
- RAMAWAT, K.G., **Secondary Plant Products in Nature**. In: *Biotechnology: Secondary Metabolites; Plants and Microbes*. K.G. and Merillon (Ed.). Science Publishers, 2007.
- RAVELO, A. G., et al. **Recent studies in natural products as anticancer agents**. *Current Topics in medicinal Chemistry*. 2009.
- RESMI C. R., et al. **Antioxidant Activity of Albizzia lebbeck (Linn.) Benth. in Alloxan Diabetic Rats**. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2006.
- ROBBERS, J. E., et al. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Ed. Premier, São Paulo, 1997.
- ROBERTS SC. **Production and engineering of terpenoids in plant cell culture**. *Nature Chemical Biology*, 2007.
- RUSSELL AD. **Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives**. *J Appl Bacteriol*. 1991.
- SALLE J-L; **Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie**. Editions Frison-Roche, 2^{ème} édition, 2004.
- SANJAY K. **Saponins of Albizia lebbek in Alzheimer and Parkinson, Disease**. *Indian Journal of Natural Products*. 2003.
- SAVOIA, D. **Plant-derived Antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics**. *Future Microbiol.*, 2012.
- SHABIR, G. A. **Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for the Determination of Hydroxybenzene in a Cream Formulation**. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010.
- SHAHID, S.A., Firdous, N. **Antimicrobial screening of Albizia lebbeck (L) Benth. and Acacia leucophloea (Roxb.)**. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012.
- SJOSTROM, E.; **WOOD CHEMISTRY. Fundamentals and Applications**. Academic Press. New york. .223 p.1981.
- SINGH Y. N., et al. **Effect of Dry Seed Extract of a Medicinal Plant Albizzia lebbeck on Testicular and Epididymal Protein Profiles of Rat**. *Himalayan Journal of Environment and Zoology*, 1991.

SUDHARSHAN, S.J. ET AL., **Radical scavenging activity, phenol and flavonoid content of selected traditionally used Indian medicinal plants.** Asian Journal of Experimental Sciences, 2010.

THE AYURVEDIC PHARMACOPOEIA OF INDIA. 3. Vol. Part I. Albizzia lebeck Bent. GOVERNMENT OF INDIA MINISTRY OF HEALTH AND FAMILY WELFARE DEPARTMENT OF ISM & H. 201p. 2001.

TIWARI P., et al. **Phytochemical screening and extraction:** a Review. Int Pharm Sci, 2011.

TONGNUANCHAN, P; BENJAKUL, S. **Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation.** Journal of Food Science, 2014.

TOSUN H., et al. **Antioxidant properties and Total phenolic content of eight Salvia Species from Turkey.** Journal of Turkish Biology, 2009

U.S. Food and Drug Administration. FDA Public Health. FDA Retrieved August 5, 2008.

WEYENS N., et al. **Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge.** Curr Opin Biotechnol, 2009.

ZAIKA LL. **Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination.** J Food Nutr, 1988.

ZIA-UI-HAQ, M. et al., **Antioxidant Activity of the Extracts of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Cultivars Commonly Consumed in Pakistan,** 2013.