

CLÁUDIA ALEXANDRA DE ANDRADE

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FLORES E DAS FOLHAS DE  
*Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON,  
LEGUMINOSAE - MIMOSOIDEAE**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel.

CURITIBA - PR  
2010

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR pela oportunidade de realizar o doutorado.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela amizade e convívio.

Reitero minha gratidão ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela orientação, apoio, dedicação, amizade e constante acompanhamento ao longo das várias etapas da realização desta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel pelo apoio, amizade e acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber pela orientação inicial deste trabalho, pela amizade e pelo auxílio nas análises espectrométricas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tomoe Nakashima pela cooperação valiosas sugestões na realização dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello do Departamento de Química da UFPR pela realização da espectrometria de ressonância magnética nuclear e auxílio na sua análise.

Ao botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba, pela identificação da espécie vegetal.

À Prof<sup>a</sup>. Wanda Mocalewiski Abrahão e à funcionária Geni Peruzzo, do Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, à farmacêutica Carmen Etsuko Kataoka Higaskino e à técnica Siumara Costa da Cruz Almeida do TECPAR pela cooperação na avaliação da atividade antibacteriana.

Ao Prof. Dr José Domingos Fontana e ao Dr Maurício Passos pelo auxílio na hidrólise do composto.

Aos amigos Cristina Mayumi e Karina Bora pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Aos amigos Cristina Peitz, Josiane de Fátima Gaspari Dias, João Luiz de Souza Carvalho, Miriam Machado Cunico e demais colegas do laboratório de fitoquímica, pelo companheirismo e auxílio ao longo desta pesquisa.

Aos meus alunos de Iniciação Científica da Unibrasil, Carlos Alberto Bogo, Karen Sugimoto e Ellen de Moraes, pela cooperação na realização dos testes antioxidantes com DPPH e na alelopatia.

Minha gratidão à minha família e ao meu esposo Vladimir pelo amor e paciência, compreendendo os difíceis momentos que envolveram a execução deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

*Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae, é uma espécie exótica, vastamente difundida no Sul do Brasil. Avaliações fitoquímicas demonstraram flavonóides, taninos, compostos fenólicos e esteroides/triterpenoides nas flores; alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, quinonas e esteroides/triterpenoides nas folhas. Para o conteúdo de compostos fenólicos, utilizando o reativo de Folin Ciocalteu, a fração acetato de etila das flores e das folhas demonstrou os maiores teores. As frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e o resíduo dos extratos etanólicos das flores e das folhas foram submetidos a métodos cromatográficos para o isolamento de substâncias. Como substâncias fenólicas majoritárias foram obtidas as flavanonas 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina e naringenina, e a  $\beta$ -dicetona 16, 18 tritriacontanodiona. As análises da atividade antibacteriana (bioautografia, difusão em disco e concentração inibitória mínima) demonstraram ser mais ativa a fração acetato de etila das flores e das folhas, inibindo cepas bacterianas gram positivas e gram negativas, em graus variáveis. Para as substâncias isoladas, nas concentrações testadas, apenas a naringenina foi ativa. Para a ação antioxidante, utilizando o radical livre 2,2-difenil, 1-picrilhidrazil (DPPH), formação do complexo fosfomolibdênio e o teste TBARS, destaque especial também apresentou a fração acetato de etila, demonstrando-se até mais ativa que os padrões utilizados, dependendo da técnica que foi utilizada. As flavanonas isoladas também demonstraram atividade, ainda que em menor grau que suas frações originárias; para a 16, 18 tritriacontanodiona esta atividade foi muito discreta. Na avaliação de toxicidade geral pela *Artemia salina*, a fração diclorometano obtida das flores demonstrou ser a mais citotóxica nestes ensaios. Sobre o potencial alelopático, observado nas sementes de *Lactuca sativa*, variedade Babá, para as amostras obtidas das flores e das folhas, embora não tenham afetado a germinação desta plântula, ocasionaram significativas influências no seu crescimento, quando comparadas ao controle. As substâncias isoladas também apresentaram efeitos significativos no crescimento, contribuindo na atividade alelopática verificada com as suas frações de origem.

**Palavras-chave:** *Acacia podalyriifolia*, compostos fenólicos, flavanonas,  $\beta$ -dicetonas, 16, 18 tritriacontanodiona, antibacteriana, antioxidante, citotoxicidade, alelopático.

## ABSTRACT

*Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae, is an exotic species, widely distributed in southern Brazil. Phytochemical evaluations performed showed the presence of flavonoids, tanines, phenolic compounds and steroids/terpenoids in the flowers, while the material obtained from the leaves were ascertained alkaloids, coumarins, flavonoids, tanines, phenolic compounds, quinones, and steroids/terpenoids. In determining the content of phenolic compounds using the Folin Ciocalteu reagent, the ethyl acetate fractions from the flowers and the leaves had presented the greatest content of phenolic compounds. The hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions and the residue which precipitated in the obtaining of ethanol extracts from the flowers and leaves were submitted to chromatographic methods for the isolation of substances. As isolated and identified phenolic major compounds from the flowers and the leaves were obtained the flavanones 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenine and naringenine, and the  $\beta$ -diketone denominated 16, 18 tritriacontanedione. The analysis of antibacterial activity, carried out by bioautography, disk diffusion and minimum inhibitory concentration proved that the ethyl acetate fraction obtained from both the leaves and flowers, is the most active, inhibiting gram positive and gram negative bacterial strains, in degrees variable depending on the strain used. For the isolated compounds, in the evaluated concentrations, only naringenin has demonstrated antibacterial action. For the antioxidant activity, performed by the methodologies which employ the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), phosphomolybdenum complex formation and TBARS test, it should be specially noted that it also showed the ethyl acetate fraction, demonstrating to be even more active than the standards used, depending on which technique was used. The isolated flavanones demonstrated antioxidant activity, although lower than the played by the original fractions; for the 16, 18 tritriacontanedione, this activity was very slight. In the evaluation of general toxicity using the *Artemia salina*, the dichloromethane fraction obtained from the flowers proved to be the most cytotoxic in these assays. Regarding the allelopathic potential observed on the seeds of *Lactuca sativa*, variety "Babá", against the samples obtained from flowers and leaves, although it has not affected the germination of seedlings, caused significant influences on the growth when compared to control. The isolated compounds presented significant effects on seedling growth, contributing to the allelopathic activity observed with their origin fractions.

**Keywords:** *Acacia podalyriifolia*, phenolic compounds, flavanones,  $\beta$ -diketones, 16, 18 tritriacontanedione, antibacterial, antioxidant, cytotoxicity, allelopathic.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLARES DE <i>Acacia podalyriifolia</i> A. CUNN. EX G. DON .....	28
FIGURA 2 - ASPECTO GERAL DAS FLORES E FOLHAS DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	29
FIGURA 3 – FÓRMULA GERAL DOS FLAVONOIDES .....	32
FIGURA 4 – PRINCIPAIS CATEGORIAS DE FLAVONOIDES .....	33
FIGURA 5 -FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO .....	49
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXÂNICA FLOR .....	51
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO FLOR .....	53
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA .....	57
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DO RESÍDUO DO EXTRATO ETANÓLICO .....	59
FIGURA 10 –BRANCO (ÁGUA) PREPARADO PARA OS TESTES DE ALELOPATIA .....	72
FIGURA 11 – ESPECTRO DE IV DA SUBSTÂNCIA OBTIDA DA FRAÇÃO FAER 4 .....	77
FIGURA 12 -ESPECTROS DE UV DO COMPOSTO FAER 4 .....	79
FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO FAER 4 .....	82
FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO FAER 4 .....	83
FIGURA 15 – CCD COM A AMOSTRA FAER 4, PADRÃO DE NARINGENINA E AMOSTRA + NARINGENINA .....	84
FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA NARINGENINA .....	85
FIGURA 17 – ESPECTRO DE IV DA SUBSTÂNCIA OBTIDA DA FRAÇÃO FAER 20 .....	86
FIGURA 18 – ESPECTROS DE UV DA SUBSTÂNCIA OBTIDA DA FRAÇÃO FAER 20 .....	88
FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO FAER 20 .....	90
FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO FAER 20 .....	91
FIGURA 21 – CCD COM A AMOSTRA FAER 20 SUBMETIDA À HIDRÓLISE COM TFA 4N E OS RESPECTIVOS PADRÕES ... ..	93
FIGURA 22 – ESTRUTURA QUÍMICA DE 5-β-D-GLICOSIL NARINGENINA .....	94
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA FAES 9 .....	96
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA FAES 9 .....	97
FIGURA 25 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO PARA A SUBSTÂNCIA RES .....	103
FIGURA 26 – ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DA SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DA SUBSTÂNCIA RES .....	104
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA RES .....	105
FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA RES .....	106
FIGURA 29 – ESPECTRO DE DEPT DA SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE RES .....	107
FIGURA 30 – ESTRUTURA DA 16,18 TRITRIACONTANODIONA .....	109
FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FDCM E DA SUBSTÂNCIA NARINGENINA EM <i>Staphylococcus aureus</i> , POR BIOAUTOGRAFIA, FASE MÓVEL 1 .....	115

FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FDCM E DA SUBSTÂNCIA NARINGENINA EM <i>Staphylococcus aureus</i> , POR BIOAUTOGRAFIA, FASE MÓVEL 2 .....	116
FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FAE EM <i>Proteus mirabilis</i> , POR BIOAUTOGRAFIA .....	117
FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FAE FOL E FHEX FLOR EM <i>Staphylococcus aureus</i> , POR DIFUSÃO EM DISCO .....	118
FIGURA 35 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA NAR GLI EM <i>Staphylococcus aureus</i> .....	119
FIGURA 36 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA FAE FOL EM <i>Staphylococcus aureus</i> .....	120
FIGURA 37 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO .....	127
FIGURA 38 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CCD NEBULIZADA COM DPPH .....	128
FIGURA 39 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS SUBSTÂNCIAS NAR, NAR GLI E DOS PADRÕES DE RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO, POR CCD NEBULIZADA COM DPPH .....	129
FIGURA 40 – CAIXAS GERBOX CONTENDO AS 40 SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> , NO 6º DIA DE GERMINAÇÃO (CONTROLE) .....	137
FIGURA 41 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	138
FIGURA 42 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	139
FIGURA 43 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE À FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FLORES DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	140
FIGURA 44 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE À FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	140
FIGURA 45 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE À FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS FLORES DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	141
FIGURA 46 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE À FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	142
FIGURA 47 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	142
FIGURA 48 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Acacia podalyriifolia</i> .....	143
FIGURA 49 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A 5-β-D-GLICOSIL NARINGENINA .....	144

FIGURA 50 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A NARINGENINA .....	145
FIGURA 51 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A 16,15 TRITRIACONTANODIONA .....	146



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Acacia podalyriifolia</i> A. CUNN. EX G. DON.....	20
TABELA 2 – TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS ETANÓLICOS E NAS FRAÇÕES .....	74
TABELA 3 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E DAS SUAS FRAÇÕES .....	75
TABELA 4 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA FAER 4 .....	78
TABELA 5 – DADOS DOS ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$ DA FAER 4 .....	81
TABELA 6 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA FAER 20 .....	87
TABELA 7 – DADOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA FAER 20 .....	92
TABELA 8 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA O COMPOSTO FAES 9 .....	95
TABELA 9 – DADOS DOS ESPECTROS DE $^1\text{H}$ RMN E DE $^{13}\text{C}$ RMN DA SUBSTÂNCIA FAES 9 .....	98
TABELA 10 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA FDCMS 2 .....	100
TABELA 11 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA FDCMS 8 .....	101
TABELA 12 – DADOS DOS ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA OBTIDA DO RESÍDUO DO EXTRATO ETANÓLICO .....	108
TABELA 13 – TEOR DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FLORES E DAS FOLHAS.....	111
TABELA 14 – TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR BIOAUTOGRAFIA .....	122
TABELA 15 - TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DIFUSÃO EM DISCO .....	123
TABELA 16 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	124
TABELA 17 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO .....	126
TABELA 18 - ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ) .....	130
TABELA 19 – ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) PELO TESTE TBARS .....	132
TABELA 20 – TOXICIDADE GERAL DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS.....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

AAPH	dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
Abs <sub>amostra</sub>	absorbância da amostra
Abs <sub>branco</sub>	absorbância do branco
Abs <sub>controle</sub>	absorbância do controle
AcEt	acetato de etila
AlCl <sub>3</sub>	cloreto de alumínio
BHT	butilhidróxitolueno
CLO	padrão de cloranfenicol
CCD	cromatografia em camada delgada
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
<sup>13</sup> C RMN	espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
EC <sub>50</sub>	quantidade de antioxidante para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH
EE FLOR	extrato etanólico das flores
EE FOL	extrato etanólico das folhas
EM	espectrometria de massa
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAE FLOR	fração acetato de etila das flores
FAE FOL	fração acetato de etila das folhas
FAER 4	substância do remanescente da fração acetato de etila das flores
FAER 20	substância do remanescente da fração acetato de etila das flores
FAER FOL	substância do remanescente da fração acetato de etila das folhas
FAES 9	substância do sedimento da fração acetato de etila das flores
FAES FLOR	substância do sedimento da fração acetato de etila das folhas
FDCM FLOR	fração diclorometano das flores
FDCM FOL	fração diclorometano das folhas
FDCMS 10	mistura de substâncias obtida da fração diclorometano das flores
FDCMS 2	substância obtida da subfração 2 da fração diclorometano das flores
FHEX FLOR	fração hexânica das flores
FHEX FLOR 1	substância da fração hexânica das flores
FHEX FOL	fração hexânica das folhas
FHEX FOL1	substância obtida da fração hexânica das folhas

HCl	ácido clorídrico
HCOOH	ácido fórmico
H <sub>2</sub> O	água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ácido bórico
<sup>1</sup> H RMN	espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IA	índice antioxidante
IV	espectrometria de infravermelho
MDA	malonildialdeído
MeOH	metanol
NaOAc	acetato de sódio
NaOMe	metóxido de sódio
NAR	naringenina isolada das flores e das folhas
NARGLI	5-β-D-glicosil naringenina isolada das flores e das folhas
NEU	reativo formado por difenilboriloxietilamino a 1% em metanol
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
OH·	radical hidroxila
P. A .	para análise
PF	ponto de fusão
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
RES	substância obtida do resíduo do extrato etanólico das flores
RES FOL	substância obtida do resíduo do extrato etanólico das folhas
ROO·	radical peroxila
rpm	rotações por minuto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TFA	ácido trifluor acético
UV	espectrometria de ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3 REVISÃO</b>	20
3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	20
3.1.1 Gênero <i>Acacia</i>	20
3.1.1.1 Características gerais	20
3.1.1.2 Aplicações e usos	21
3.1.2 Considerações sobre <i>Acacia podalyriifolia</i>	27
3.1.2.1 Sinonímia vulgar	27
3.1.2.2 Sinonímia científica	27
3.1.2.3 Aspectos gerais	27
3.2 FITOQUÍMICA	29
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	30
3.3.1 Flavonoides	31
3.3.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos	34
3.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	34
3.4.1 Aspectos gerais da atividade antibacteriana	34
3.4.2 Atividade antibacteriana no gênero <i>Acacia</i>	36
3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	37
3.5.1 Aspectos gerais	37
3.5.2 Atividade antioxidante no gênero <i>Acacia</i>	41
3.6 ENSAIO DE TOXICIDADE GERAL PELA <i>Artemia salina</i>	42
3.6.1 Aspectos gerais	42
3.6.2 Citotoxicidade no gênero <i>Acacia</i>	44
3.7 AÇÃO ALELOPÁTICA	45
3.7.1 Alelopatia: características gerais	45
3.7.2 Atividade alelopática no gênero <i>Acacia</i>	46
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	47
4.2 CONSERVAÇÃO	47
4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSTÂNCIAS	47
4.3.1 Obtenção do extrato etanólico	47
4.3.2 Fracionamento do extrato etanólico	48
4.3.3 Pesquisa de grupamentos fitoquímicos nos extratos e frações	50

4.3.4 Isolamento de substâncias das flores e das folhas .....	50
4.3.4.1 Fração hexânica .....	50
4.3.4.2 Fração diclorometano .....	52
4.3.4.3 Fração acetato de etila .....	55
4.3.4.4 Resíduo do extrato etanólico .....	58
4.3.5 Identificação das substâncias isoladas das frações diclorometano, acetato de etila e do resíduo do extrato etanólico .....	60
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	61
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	62
4.5.1 Bioautografia .....	62
4.5.2 Difusão em disco .....	64
4.5.3 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	65
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	66
4.6.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio .....	66
4.6.2 Ensaio com o radical livre DPPH .....	67
4.6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada .....	67
4.6.2.2 Avaliação da redução do radical DPPH por espectroscopia UV-vis .....	67
4.6.3 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	68
4.7 ENSAIO DE TOXICIDADE GERAL PELA <i>Artemia salina</i> .....	70
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	71
4.8.1 Teste da germinação .....	73
4.8.2 Teste do crescimento .....	73
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
5.1 TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	74
5.2 PESQUISA DE GRUPAMENTOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	75
5.3 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS .....	76
5.3.1 Fração acetato de etila das flores .....	76
5.3.1.1 Fração remanescente .....	76
5.3.1.2 Fração sedimentada .....	94
5.3.2 Fração acetato de etila das folhas .....	98
5.3.2.1 Fração remanescente .....	98
5.3.2.2 Fração sedimentada .....	99
5.3.3 Fração diclorometano das flores .....	99
5.3.3.1 Material cristalizado das frações 10 a 18 .....	100
5.3.3.2 Material cristalizado das frações 19 a 39 .....	100
5.3.3.3 Material cristalizado das frações 40 a 100 .....	101
5.3.4 Fração diclorometano das folhas .....	102

5.3.5 Resíduo do extrato etanólico das flores .....	102
5.3.6 Resíduo do extrato etanólico das folhas .....	109
5.3.7 Fração hexânica das flores .....	110
5.3.8 Fração hexânica das folhas .....	110
5.4 TEOR DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	111
5.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS .....	112
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	113
5.6.1 Bioautografia .....	114
5.6.2 Difusão em disco .....	117
5.6.3 Concentração inibitória mínima .....	119
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	125
5.7.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio .....	125
5.7.2 Ensaio com o radical livre DPPH .....	127
5.7.2.1 Avaliação da atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada .....	128
5.7.2.2 Avaliação da redução do DPPH por espectroscopia de UV-vis .....	129
5.7.3 Atividade antioxidante pelo teste TBARS .....	131
5.8 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE GERAL .....	135
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	136
5.9.1 Teste de germinação .....	137
5.9.2 Teste do crescimento .....	137
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>148</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>189</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no controle de diversas enfermidades e pragas tem sido prática comum por populações de todos os continentes, desde períodos remotos.

Uma grande variedade de vegetais vem sendo utilizado no Brasil e em vários países como fonte alternativa de medicamentos. Apenas no Brasil, estima-se que pelo menos 25% do faturamento da indústria farmacêutica nacional esteja relacionado com produtos derivados de plantas (GUERRA; NODARI, 2001).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permitiram aos pesquisadores isolar substâncias biologicamente ativas a partir de diferentes espécies vegetais. Estas substâncias podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos como de outros produtos de interesse diverso, como a aplicação na agricultura (GUERRA; NODARI, 2001; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Os produtos naturais de origem vegetal apresentam uma ampla arquitetura molecular, constituindo-se numa importante fonte de substâncias-modelo, fundamentais na pesquisa para se atingir diferentes alvos biológicos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). Esta variedade de substâncias químicas nas plantas pode ser proveniente do metabolismo primário ou secundário.

Do metabolismo primário resultam os carboidratos, as proteínas e as gorduras, essenciais a todos os seres vivos e que podem ser utilizados na alimentação tanto dos seres humanos quanto de outros animais. Através de rotas bio-sintéticas diversas, os produtos do metabolismo primário originam substâncias do metabolismo secundário. As substâncias do metabolismo secundário são necessárias tanto para a sobrevivência e preservação das espécies vegetais, garantindo sua reprodução, assim como também pelas interações planta-planta, denominada alelopatia, com interferências na germinação e no crescimento de outros vegetais, favorecendo ou prejudicando seu desenvolvimento (MEDEIROS, 1990; POSER; MENTZ, 2001).

Os metabólitos secundários são encontrados normalmente em concentrações bem mais baixas que as substâncias do metabolismo primário. Podem ser classificados em diferentes categorias, como flavonoides, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, compostos quinoides, alcaloides, saponinas, esteroides/triterpenoides, dentre outros, estando presentes em determinados grupos de plantas. As atividades biológicas encontradas nestas plantas estão geralmente relacionadas às substâncias do metabolismo secundário (POSER; MENTZ, 2001).

Dentre os inúmeros exemplares cultivados no Brasil, o gênero *Acacia* é amplamente difundido, principalmente na região Sul, com aplicações diversas: extração de taninos; programas de reflorestamento ou como planta ornamental (BURKART, 1979).

Estudos quimiotaxonômicos relacionam o gênero *Acacia* como reconhecida fonte de substâncias fenólicas (KERBER; SILVA, 1993; ANDRADE *et al.*, 2003 a), os quais apresentam uma variedade de ações biológicas (DUROUX *et al.*, 1998), dentre as quais se ressaltam as atividades antibacteriana e alelopática. Além disto, também são encontrados inúmeros trabalhos sobre atividade antiinflamatória, antioxidante e antitumoral (ANDRADE *et al.* 2003 a; MEERA *et al.* 2005).

Os microorganismos patogênicos vêm se apresentando cada vez mais resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis, o que leva à busca por novas substâncias de estrutura química diversa, que atuem como agentes antimicrobianos, obtidos a partir de fontes naturais (SUTCLIFFE, 2003).

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas (CHEESEMAN; SLATER, 1996). O termo “espécies reativas de oxigênio” inclui os radicais livres contendo oxigênio e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete (GÓTH; VITAI, 2003; GÜLCIN *et al.*, 2003).

As células do organismo humano são continuamente atacadas por estas espécies reativas de oxigênio. Em situações patológicas ou fisiológicas nas quais haja desequilíbrio entre a geração destas e a sua inativação pelos sistemas antioxidantes, pode haver danos em componentes celulares, com conseqüente envolvimento no envelhecimento e na gênese de inúmeras doenças tais como inflamação crônica, aterosclerose e câncer (AL-MAMARY *et al.*, 2002; YORBIK *et*



*al.*, 2002; GÜLCIN *et al.*, 2003). Muitas substâncias obtidas das plantas têm se mostrado eficientes como removedores de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano contra a sua atuação, bem como retardando o aparecimento de doenças crônicas (GÜLCIN *et al.*, 2003). Neste sentido, considerou-se relevante a avaliação de antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo provocado por agentes oxidantes.

A pesquisa por novas drogas com atividade citotóxica tem sido muito incentivada para uma possível utilização no tratamento do câncer. No entanto, as técnicas disponíveis para a avaliação de citotoxicidade demandam grande disponibilidade de recursos e de tempo, o que muitas vezes dificulta a execução destes trabalhos. Diversos pesquisadores que atuam no desenvolvimento de novas drogas antitumorais obtidas de produtos naturais têm demonstrado correlações positivas entre a letalidade da *Artemia salina* frente a estes produtos e a citotoxicidade, sendo inclusive esta técnica recomendada como um efetivo ensaio preliminar para avaliar a citotoxicidade e atividades antitumorais (MEYER *et al.*, 1982; ANDERSON *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2009).

Além das atividades farmacológicas que os metabólitos secundários possam exercer, a presença de substâncias com ação alelopática pode influenciar a obtenção de matéria-prima vegetal para a produção de fitoterápicos. As substâncias aleloquímicas podem afetar a produtividade, além de se constituir em uma alternativa ao uso dos defensivos agrícolas, propiciando maior segurança, menores efeitos deletérios ao ecossistema e custos reduzidos (CHOU, 1998). A busca por herbicidas que possam ser extraídos de fontes naturais é essencialmente importante para as plantas medicinais, uma vez que não é recomendado o uso de agrotóxicos sintéticos no cultivo das mesmas, pois pode haver contaminação com resíduos tóxicos, ocasionando problemas para a saúde, como também reduzindo a concentração dos princípios ativos do vegetal (REIS; MARIOT, 2001).

A escassez de estudos fitoquímicos para a *Acacia podalyriifolia*, integrante de um gênero que apresenta um grande número de espécies com importantes atividades biológicas, muitas destas atribuídas aos compostos fenólicos, com predominância dos efeitos alelopáticos e das ações antimicrobiana, citotóxica e antioxidante, aqui avaliadas, motivou a realização deste trabalho de pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química majoritária das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, com ênfase nas substâncias fenólicas, bem como testar algumas de suas atividades biológicas possíveis (antibacteriana, antioxidante, citotoxicidade e alelopática).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o extrato etanólico, as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don., por meio de Soxhlet;
- b) Realizar a triagem fitoquímica do extrato etanólico e suas frações das flores e folhas;
- c) Realizar a determinação do conteúdo de compostos fenólicos do extrato etanólico e frações obtidos das flores e das folhas, empregando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu;
- d) Isolar, purificar e identificar substâncias fenólicas majoritárias das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e folhas empregando métodos cromatográficos clássicos;
- e) Examinar possível ação antibacteriana do extrato etanólico, suas frações e das substâncias isoladas, das flores e folhas, contra patógenos humanos gram-positivos e gram-negativos, utilizando bioautografia, difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima;
- f) Testar possível atividade antioxidante (*in vitro*) do extrato etanólico, suas frações e substâncias isoladas, das flores e folhas, através de metodologias envolvendo a formação do complexo fosfomolibdênio, o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e inibição da peroxidação lipídica utilizando o teste TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico);

- g) Avaliar a citotoxicidade geral do extrato etanólico, suas frações e das substâncias isoladas, das flores e folhas, utilizando a *Artemia salina*.
- h) Estudar a atividade herbicida potencial ou de estímulo ao crescimento vegetal, através de interações alelopáticas, do extrato etanólico, das suas frações e das substâncias isoladas, das flores e folhas, verificando os seus efeitos na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa*.

### 3. REVISÃO

#### 3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

A Tabela 1 representa o enquadramento taxonômico de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don., segundo os sistemas estabelecidos por ENGLER (JOLY, 1998) e CRONQUIST (1988).

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON, SEGUNDO ENGLER (JOLY, 1998) E CRONQUIST (1988)

CLASSIFICAÇÃO	ENGLER	CRONQUIST
CLASSE	Dicotyledonea	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Archichlamydeae	Rosidae
ORDEM	Rosales	Fabales
FAMÍLIA	Leguminosae	Mimosaceae
SUBFAMÍLIA	Mimosoideae	_____
GÊNERO	<i>Acacia</i>	<i>Acacia</i>
ESPÉCIE	<i>podalyriifolia</i>	<i>podalyriifolia</i>
NOME	<i>Acacia podalyriifolia</i>	<i>Acacia</i>
	A. Cunn. ex G. Don.	<i>podalyriifolia</i>
		A. Cunn. ex G. Don.

#### 3.1.1 Gênero *Acacia*:

##### 3.1.1.1 Características Gerais:

O gênero *Acacia* é um dos maiores nas Angiospermas, apresentando mais de 1.350 espécies (SEIGLER, 2003). As espécies deste gênero podem se apresentar como árvores, arbustos ou trepadeiras lenhosas, contendo espinhos ou acúleos, raras vezes inermes na América. As folhas são bipinadas, multijugadas ou reduzidas a

filódios (folhas modificadas que apresentam limbo reduzido e pecíolo alargado) (BURKART, 1979; DUARTE; WOLF, 2005; MEERA; CHANDER; KALIDHAR, 2005). As flores são pequenas, hermafroditas ou polígamas. A casca é geralmente um poderoso adstringente e tônico. Muitas espécies apresentam goma (MEERA; CHANDER; KALIDHAR, 2005).

São encontradas em regiões tropicais e subtropicais, sendo muito abundantes em savanas e matas, bem como em matas xerófitas, na América tropical, África, Ásia e Austrália, sendo nesta última onde se encontra a maioria das espécies, manifestando um extraordinário endemismo e proliferação evolutiva de espécies com filódios (BURKART, 1979).

#### 3.1.1.2 Aplicações e usos:

O cultivo de espécies pertencentes ao gênero *Acacia* é amplamente difundido no Brasil, principalmente na região Sul, com aplicações diversas: como ornamental; em curtumes; em perfumaria; para extração de gomas; na fixação de dunas; na formação de cercas vivas, com as espécies aculeadas (BURKART, 1979; CORREA, 1984).

Estudos etnobotânicos revelaram que diferentes espécies de *Acacia* têm sido empregadas no tratamento das mais diversas patologias. Na Somália utiliza-se a goma de *A. tortilis*, conhecida como Qurac, contra a asma (HAGOS; SAMUELSSON, 1988). No tratamento de enfermidades do trato respiratório, diarréias e hemorróidas é utilizada *Acacia nilotica*, devido às suas propriedades tônicas, adstringentes e estimulantes (NABI *et al.*, 1992). No Zimbábue esta planta é utilizada no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (KAMBIZI; AFOLAYAN, 2001). *Acacia mellifera* e *A. kirkii* são utilizadas no tratamento do câncer; na amenorréia é empregada *A. pentagona*; em crises asmáticas é utilizada *A. polycantha*; na esquistossomose é empregada *A. robusta* (CHHABRA *et al.*, 1990); no tratamento de doenças da pele é utilizada *A. concinna* (SEKINE *et al.*, 1997).

Inúmeras atividades biológicas descritas para espécies de *Acacia* foram confirmadas em ensaios utilizando diferentes extratos e também para substâncias obtidas do fracionamento destes, as quais encontram-se aqui apresentadas.

- **Atividade alelopática:** muito pesquisada no gênero *Acacia*, sendo referenciada para *Acacia albida* (BHEEMAIHAH *et al.*, 1992); *A. aulacocarpa* (CHOU *et al.*, 1998); *A. auriculiformis* (JADHAV; GAYNAR, 1992; RAO *et al.*, 1994; DHAWAN *et al.*, 1995; BARMAN *et al.*, 1997; CHOU *et al.*, 1998; BORA *et al.*, 1999; JOHN; NAIR, 1999; HOSSAIN *et al.*, 2002; KRISHNA *et al.*, 2005; DJEGO; SINSIN, 2006); *A. cincinnata* (CHOU *et al.*, 1998); *A. confusa* (CHOU *et al.*, 1998); *A. crassicarpa* (CHOU *et al.*, 1998); *A. cyclops* (RUTHERFORD; POWRIE, 1993); *Acacia dealbata* (CASAL *et al.*, 1985; CARBALLEIRA; REIGOSA, 1999); *A. holoserica* (SRINIVASAN *et al.*, 1990); *A. leptocarpa* (CHOU *et al.*, 1998); *A. leucophloea* (PRABAKARAN; VIJAYALAKSHIMI, 2005); *A. longifolia* (PEITZ, 2003); *A. mangium*, (CHOU *et al.*, 1998; DJEGO; SINSIN, 2006); *A. mellifera* (SANKER; RAI, 1993); *A. mollissima* (*A. mearnsii*) (KITOU; YOSHIDA, 1993; GONZÁLEZ *et al.*, 1995; SCHUMANN *et al.*, 1995; KITOU; YOSHIDA, 1998); *A. nilotica* (*A. arabica*) (SWAMINATHAN *et al.*, 1989; KOUL *et al.*, 1991; SINGH; LAKSHMINARAYANA, 1992; SHARMA; SAXENA, 1993; DHAWAN *et al.*, 1995; KAMAL *et al.*, 1997; CHANNAL *et al.*, 2000; PRABAKARAN; VIJAYALAKSHIMI, 2005); *A. polystachya* (CHOU *et al.*, 1998); *A. senegal* (FADL *et al.*, 1997) e *A. tortilis* (MANJIT *et al.*, 1991; ANURAG *et al.*, 1996; CHOU *et al.*, 1998).

- **Analgésica/antipirética/antiinflamatória:** demonstrada para *A. adsurgens* (LI *et al.*, 2003); *A. ancistrocarpa* (LI *et al.*, 2003); *A. catechu* (RAY; SHARATCHANDRA; THOKCHAM, 2006; ALTAVILLA; SQUADRITO, 2009); *A. confusa* (WU *et al.*, 2008); *A. cornigera* (MALDINI *et al.*, 2009); *A. ehrenbergiana* (RISK *et al.*, 1985); *A. farnesiana* (TRIVEDI *et al.*, 1986; LIN *et al.*, 2009); *A. karro* (ADEDAPPO *et al.*, 2008); *A. melanoxyton* (POLYA; FOO, 1994); *A. nilotica* (*A. arabica*) (DAFALLAH; AL-MUSTAFA, 1996; SEEMA; MASSOD; DAR, 2002; ROHINI *et al.*, 2003; ELDEEN *et al.*, 2005; CHAUBAL *et al.*, 2006); *A. pennata* (DONGMO *et al.*, 2005); *A. rehmanniana* (MCGRAW *et al.*, 1997); *A. saligna* (EL-SAWI *et al.*, 2003); *A. seyal* (ELDEEN; VAN STADEN, 2008); *A. sieberiana* (ELDEEN *et al.*, 2005) e *A. victoriae* (HARIDAS *et al.*, 2004).

- **Antiagregante plaquetária:** ação detectada por SHAH *et al.* (1997) para *A. nilotica*.

- **Antibacteriana:** muito avaliada neste gênero, pode ser verificada com *A. angustissima* (HOFFMANN *et al.*, 1993); *A. asak* (AL-FATIMI *et al.*, 2007); *A.*

*auriculiformis* (MANDAL *et al.*, 2005; PENNACCHIO *et al.*, 2005); *A. aroma* (ARIAS *et al.*, 2004); *A. bivenosa* (PENNACCHIO *et al.*, 2005); *A. catechu* (VALSARAJ *et al.*, 1997; AHMAD; MEHMOOD; MOHAMMAD, 1998; RANI; KHULLAR, 2004; VORAVUTHIKUNCHAI *et al.*, 2004; VORAVUTHIKUCHAI; LIMSUWAN, 2006; SAINI *et al.*, 2008; PATEL; KUMAR; BHATT, 2009); *A. constricta* (SALAZAR *et al.*, 2008); *A. ehrenbergiana* (YOUNIS; ELMEGEED; NASSAR, 2003); *A. erioloba* (PRETORIUS; MAGAMA; ZIETSMAN, 2003); *A. farnesiana* (WASSEL *et al.*, 1992; SOTOHY *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 2006); *A. galpinii* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. harala* (ALASBAHI *et al.*, 1999); *A. karroo* (PRETORIUS; MAGAMA; ZIETSMAN, 2003; KATERERE; ELOFF, 2004); *A. kempeana* (PALOMBO; SEMPLE, 2001; 2002); *A. koa* (BUSHNELL *et al.*, 1950); *A. leucophloea* (SRIVASTAVA, S. K.; AGNIHOTRI, V. K., 1984; PRABAKARAN; VIJAYALAKSHMI, 2005; PARIDHAVI; AGRAWAL, 2006); *A. longifolia* (PEITZ *et al.*, 2003); *A. mellifera* (KHAN *et al.*, 1980; MUTAI *et al.*, 2009); *A. mellipra* (ALMAGBOUL *et al.*, 1985); *A. mollissima* (*A. mearnsii*) (DIGRAK *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2003); *A. nilotica* (*A. arabica*) (KHAN *et al.*, 1980; ERAWARAMURTHY *et al.*, 1989; CHHABRA; UISO, 1991; CHANDEL *et al.* 1992; NABI *et al.*, 1992; WASSEL *et al.*, 1992; CLARK *et al.*, 1993; SOTOHY *et al.*, 1995; AKHTAR *et al.*, 1997; AHMAD *et al.*, 1998; ALMAGBOUL *et al.*, 1988; BAGCHI *et al.*, 1998; OMER *et al.*, 1998; KHAFAGI, 1999; MUSTAFA *et al.*, 1999; SATISH *et al.*, 1999; ALMAS, 2001; KAMBIZI; AFOLAYAN, 2001; ALI; PATRA; DWIVEDI, 2001; RANI; KHULLAR, 2004; ELDEEN *et al.*, 2005; HALIMA; KHAN; ABDUL, 2005; PRABAKARAN; VIJAYALAKSHMI, 2005; PHADNIS; TAKTE; SINGH, 2006; AL-FATIMI *et al.*, 2007; SAINI *et al.*, 2008); *A. polyacantha* (ALMAGBOUL *et al.*, 1998); *A. raddiana* (KHAFAGI; DEWEDAR, 2000); *A. robusta* (KHAN *et al.*, 1980); *A. salicina* (CHATTI *et al.*, 2009); *A. senegal* (KHAN *et al.*, 2000; ALI *et al.*, 2001); *A. sieberiana* (KHAN *et al.*, 1980; RABE; STADEN, 1997; KATERERE; ELOFF, 2004; ELDEEN *et al.*, 2005); *A. robusta* (KHAN *et al.*, 1980); *A. tetragonophylla* (PALOMBO; SEMPLE, 2001); *A. tortilis* (AL-FATIMI *et al.*, 2007) e *Acacia xanthophloea* (CHHABRA; UISO, 1991; LALL; MEYER, 1999; KATERERE; ELOFF, 2004).

- **Antidiarreica:** obtida para *A. catechu* (RAY; SHARATCHANDRA; THOKCHAM, 2006) e *A. nilotica* (ALI; PATRA; DWIVEDI, 2001; AGUNU *et al.*, 2005).

- **Antifúngica:** apresentada para *A. angustissima* (HOFFMANN *et al.*, 1993); *A. auriculiformis* (MANDAL *et al.*, 2005; MIHARA *et al.*, 2005); *A. catechu* (JANARDHANAN *et al.*, 1963; VALSARAJ *et al.*, 1997; TRIPATHI; DUBEY, 2003; SAINI *et al.*, 2008); *A. concinna* (BABU *et al.*, 2000; AHMED; ANSARI; PORCHEZHIAN, 2002; PATIL; KULKARNI, 2002; EVIJAYAKUMAR *et al.*, 2006); *A. coneini* (TRIPATHI *et al.*, 2006); *A. erioloba* (PRETORIUS; MAGAMA; ZIETSMAN, 2003); *A. farnesiana* (RODRIGUEZ; MORALES; RAMIREZ, 2000; TRIPATHI; DUBEY, 2003); *A. harala* (ALASBAHI; SAFIYEVA; CRAKER, 1999); *A. loculata* (GRAINGE; AHMED, 1988); *A. karoo* (PRETORIUS; MAGAMA; ZIETSMAN, 2003); *A. leucophloea* (JAGANNATHAN; SIVAPRAKASAM, 1996; PARIDHAVI; AGRAWAL, 2006); *A. mangium* (MIHARA *et al.*, 2005); *A. mollissima* (*A. mearnsii*) (DIGRAK *et al.*, 1999); *A. nilotica* (*A. arabica*) (JANARDHANAN *et al.*, 1963; RENU, 1983; ERAWARAMURTHY *et al.*, 1989; SUNDRIYAL, 1991; NABI *et al.*, 1992; SITANSU; DEB, 1997; BHARGAVA; SRIVASTAVA; KUMBHARE, 1998; THIRIBHUVANAMALA; NARASIMHAN, 1998; MUSTAFA *et al.*, 1999; ALI *et al.*, 2001; MURUGESAN *et al.*, 2002; TRIPATHI; DUBEY, 2003; MEENA *et al.*, 2004; HALIMA; KHAN; ABDUL, 2005; HAMZA *et al.*, 2006; SAINI *et al.*, 2008); *A. pennatula* (SANCHEZ; CHE; SANCHEZ, 2005); *A. pulchella* (ALEXANDER *et al.*, 1978; WHITFIELD *et al.*, 1981); *A. raddiana* (KHAFAGI; DEWEDAR, 2000); *A. robusta* (HAMZA *et al.*, 2006) e *A. senegal* (ALI *et al.*, 2001).

- **Antioxidante:** apresentada por *A. auriculiformis* (MIHARA *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2007); *A. catechu* (PARK; BOO, 1991; NAIK *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2006; SURVESWARAN *et al.*, 2007); *A. concinna* (SOOGARUM; WIWANITKIT; SUWANSUKSRI, 2005); *A. confusa* (CHANG *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005; TUNG *et al.*, 2007); *A. ehrenbergiana* (AL-MAMARY *et al.*, 2002); *A. galpinii* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. karoo* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. mangium* (MIHARA *et al.*, 2005); Mel obtido do pólen de espécies de *Acacia* (MEDA *et al.*, 2005; BLASA *et al.*, 2006); *A. melanoxylon* (POLYA; FOO, 1994); *A. nilotica* (*A. arabica*) (SALEEM *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2009); *A. pennata* (THALANG *et al.*, 2001; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005); *A. raddiana* (DUDAI *et al.*, 2008); *A. salicina* (BOUHLEL *et al.*, 2007; 2009; MANSOUR *et al.*, 2007; CHATTI *et al.*, 2009), *A. senegal* (MARWAH *et al.*, 2007); *A. sieberiana* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. victoriae* (HANAUSEK *et al.*, 2001);



HARIDAS *et al.*, 2001; 2004; MUJOO *et al.*, 2001) e *Acacia xanthophloea* (KATERERE; ELOFF, 2004).

- **Antiparasitária, moluscicida, algicida:** verificada com *A. auriculiformis* (MIHARA *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2007); *A. catechu* (PARK; BOO, 1991; NAIK *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2006; SURVESWARAN *et al.*, 2007); *A. concinna* (SOOGARUM; WIWANITKIT; SUWANSUKSRI, 2005); *A. confusa* (CHANG *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005; TUNG *et al.*, 2007); *A. cyanophylla* (AKKARI *et al.*, 2008); *A. ehrenbergiana* (AL-MAMARY *et al.*, 2002); *A. galpinii* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. karroo* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. mangium* (MIHARA *et al.*, 2005); *A. mearnsii* (CENCI *et al.*, 2007); Mel obtido do pólen de espécies de *Acacia* (MEDA *et al.*, 2005; BLASA *et al.*, 2006); *A. melanoxylon* (POLYA; FOO, 1994); *A. nilotica* (*A. arabica*) (SALEEM *et al.*, 2001); *A. pennata* (THALANG *et al.*, 2001; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005); *A. salicina* (BOUHLEL *et al.*, 2007; MANSOUR *et al.*, 2007); *A. salicina* (CHATTI *et al.*, 2009), *A. senegal* (MARWAH *et al.*, 2007); *A. sieberiana* (KATERERE; ELOFF, 2004); *A. victoriae* (HANAUSEK *et al.*, 2001; HARIDAS *et al.*, 2001; 2004; MUJOO *et al.*, 2001) e *Acacia xanthophloea* (KATERERE; ELOFF, 2004).

- **Antitumoral, antimutagênica e citotóxica:** presente na *A. aulacocarpa* (ZHOU *et al.*, 2001); *A. auriculiformis* (KAUR *et al.*, 2002); *A. concinna* (TEZUKA *et al.*, 2000); *A. ixiophylla* (OLIVEIRA *et al.*, 1972); *A. laeta* (NASSAR, 1999); *A. mellifera* (MUTAI *et al.*, 2004); *A. nilotica* (*A. arabica*) (KAUR *et al.*, 2002; 2005; SINGH *et al.*, 2009); *A. pennatula* (POPOCA, 1998); *A. salicina* (CHATTI *et al.*, 2009; BOUHLEL *et al.*, 2007; 2009), *A. tenuifolia* (SEO *et al.*, 2002) e *A. victoriae* (HANAUSEK *et al.*, 2001; HARIDAS *et al.*, 2001; MUJOO *et al.*, 2001; JAYATILAKE *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005).

- **Antiviral:** ação demonstrada para *A. gummifera* (MOUHAJIR *et al.*, 2001); *A. mellifera* (KANYARA; NJAGI, 2005); *A. nilotica* (*A. arabica*) (PANDEY; MOHAN, 1986; MISHRA; RAO, 1988; HUSSEIN *et al.*, 1999; 2000; BALAMURUGAN *et al.*, 2008; BHANUPRAKASH *et al.*, 2008) e *A. raddiana* (BABBAR; JOSHI; CHOWDHURY, 1983; SINGH; SINGH; PATHAK, 1994).

- **Broncodilatadora e antitussígena:** verificada com *A. dealbata* (KUMAR *et al.*, 2004); *A. farnesiana* (TRIVEDI *et al.*, 1986) e *A. senegal* (LIBERTI, 1994).

- **Contraceptiva:** obtida para *A. auriculiformis* (PAKARASHI *et al.*, 1991; MAHATO, 2000); *A. catechu* (CHOWDHURY *et al.*, 1984); *A. concinna* (BANERJI *et al.*, 1979) e *A. nilotica* (*A. arabica*) (CHOWDHURY *et al.*, 1984; SETHI; NATH; SING, 1989).

- **Dermatológica:** ação verificada para *A. leucophloea* por ATIQUE e IQBAL (1993) e ATIQUE e SIDDIQUE (1998).

- **Hepatoprotetora:** atividade verificada para *A. catechu* (JAYASEKHAR *et al.*, 1997; RAY; SHARATCHANDRA; THOKCHAM, 2006) e *A. confusa* (TUNG *et al.*, 2009).

- **Hipercolesterolêmica:** ação verificada para *A. catechu* por SIGHAL e JOSHI (1984).

- **Hipoglicemiante:** verificada com *A. catechu* (SIGH; MITTAL; BARTH WAL, 1976; SIGHAL; JOSHI, 1984; RAY; SHARATCHANDRA; THOKCHAM, 2006); *A. farnesiana* (WASSEL *et al.*, 1992); *A. nilotica* (*A. arabica*) (SIGHAL; JOSHI, 1984; AHMAD; MOIN-UD-DIN-SHAIK, 1989; WASSEL *et al.*, 1992; HEWAMANNA; ANURAADHAI; FERNANDO, 2004) e *A. suma* (SIGH; MITTAL; BARTH WAL, 1976).

- **Hipotensora:** demonstrada para *A. catechu* (SHAM; CHIU; PANG, 1984) e *A. nilotica* (*A. arabica*) (AMOS *et al.*, 1999; GILANI *et al.*, 1999).

- **Inseticida, repelente de insetos:** atividade observada para *A. albida* (BERNAYS; CHAPMAN, 1977); *A. chiapensis* (GRAINGE; AHMED, 1988); *A. concinna* (QADRI, 1973; RAJENDRAN; KAREEM, 1977; GRAINGE; AHMED, 1988); *A. confusa* (LEE *et al.*, 2000); *A. farnesiana* (GRAINGE; AHMED, 1988); *A. hockii* (EVANS; BELL, 1979); *A. longifolia* (GRAINGE; AHMED, 1988); *A. nilotica* (DASTUR, 1977 *appud* MEERA; CHANDER; KALIDHAR, 2005; DWIVEDI; GARG; KUMARI, 2000; DWIVEDI; BAJAJ, 2000) e *A. tortilis* (EVANS; BELL, 1979).

- **Relaxante muscular:** verificada com *A. bilimeckii* (LOPEZ; SALAZAR; ESTRADA, 2003); *A. concinna* (BANERJI *et al.*, 1982); *A. farnesiana* (TRIVEDI *et al.*, 1985; 1986) e *A. nilotica* (*A. arabica*) (GILANI *et al.*, 1999).

### 3.1.2 Considerações sobre *Acacia podalyriifolia* A.Cunn. ex G. Don.

#### 3.1.2.1 Sinonímia vulgar:

Acácia-mimosa (BURKART, 1979; SCHULTZ, 1990).

#### 3.1.2.2 Sinonímia científica:

*Acacia podalyriaefolia* A. Cunn.; *Acacia caleyi* A. Cunn.; *Acacia fraseri* Hook; e *Racosperma podalyriifolium* (A. Cunn) Pedley (DAYDON, 1895; DAVIES, 1991)

#### 3.1.2.3 Aspectos gerais:

*Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don é uma planta exótica, originária da Austrália, com ampla distribuição mundial (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1979; PLANTS, 2003).

Seu cultivo é vastamente difundido no sul do Brasil como planta ornamental, sendo freqüentemente encontrada em praças, jardins ou em proximidades de habitações, apresentando vistosas inflorescências amarelas que contrastam com os filódios (folhas modificadas) de coloração cinza ou cinza-fosco (BURKART, 1979; DUARTE; WOLF, 2005). Importante contribuição ao estudo morfo-anatômico desta espécie foi realizado por DUARTE e WOLF (2005), determinando caracteres anatômicos dos filódios e caule.

Neste trabalho foram empregadas as flores e os filódios de *A. podalyriifolia*, estes últimos aqui denominados simplesmente por folhas, para utilizar a mesma nomenclatura apresentada nos estudos fitoquímicos que foram anteriormente realizados com esta espécie.

As Figuras 1 e 2 apresentam a *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don.



Fonte: ANDRADE (2004)

FIGURA 1 – EXEMPLARES DE *Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON NO LOCAL DA COLETA (JARDIM BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA, PARANÁ).



Fonte: <http://www.dalie.com.au/farm/trees.htm>

FIGURA 2 - ASPECTO GERAL DAS FLORES E FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON.

### 3.2 FITOQUÍMICA

Ainda que somente um pequeno número de espécies *Acacia* tenha sido avaliado mais detalhadamente quanto à sua composição química, uma variedade de destas substâncias foi encontrada neste gênero, tendo sido relatada a presença de aminas, aminoácidos não-protéicos, alcaloides, glicosídeos cianogenéticos, óleos essenciais, esteroides, terpenoides, saponinas, quinonas, gomas, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, com predominância das

substâncias com núcleo fenólico, conforme foi demonstrado nos trabalhos de revisão realizados por ANDRADE *et al.* (2003 a), SEIGLER (2003) e MEERA; CHANDER; KALIDHAR (2005).

Os trabalhos fitoquímicos descritos para *Acacia podalyriifolia* foram realizados com as folhas, sementes, goma e flores desta espécie. Alcaloides foram obtidos por WHITE (1943) e por BALLANDRIN *et al.* (1978) a partir do extrato etanólico das folhas. A partir da graxa obtida das folhas, HORN e LAMBERTON (1962) e HORN, KRANZ e LAMBERTON (1964) obtiveram hidrocarbonetos diversos e uma  $\beta$ -dicetona. Das sementes desta espécie foram obtidos aminoácidos não-proteicos por SENEVIRATNE e FOWDEN (1968) e por EVANS, QURESHI e BELL (1977). Polissacarídeos da goma foram analisados por BEKKER *et al.* (1968; 1969; 1972), CHURMS *et al.* (1970; 1977) e por ANDERSON e BELL (1976). A partir das flores, do fracionamento do extrato etanólico com diclorometano, foram obtidas substâncias fenólicas (ANDRADE, 2003 a).

### 3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Estudos quimiotaxonômicos relacionam o gênero *Acacia* como reconhecida fonte de substâncias fenólicas (ANDRADE, 2003 a; ANDRADE *et al.*, 2003 b; SEIGLER, 2003; MEERA; CHANDER; KALIDHAR, 2005).

Os compostos fenólicos constituem a maior categoria de metabólitos secundários das plantas, incluindo nestes os ácidos fenólicos e os flavonoides (JUSTESEN; KNUTHSEN, 2001). São atribuídas inúmeras atividades biológicas para este grupo (DUROUX *et al.*, 1998; JUSTESEN; KNUTHESE, 2001; SEIGLER, 2003), incluindo antibacteriana, antioxidante, citotóxica e alelopática, discutidas neste trabalho.

### 3.3.1 Flavonoides

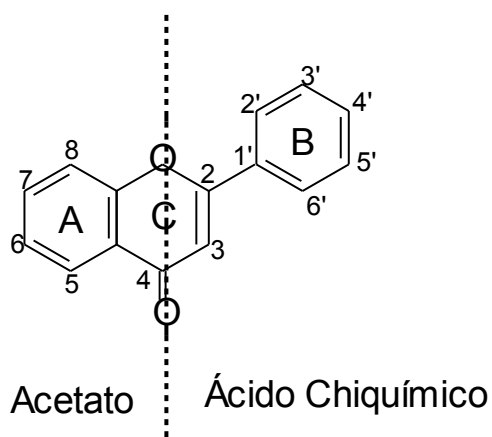
Os Flavonoides estão entre os compostos fenólicos mais encontrados nos vegetais, sendo conhecidos mais de 5.000 estruturas diferentes (STRACK, 1997). Muitos são coloridos, incluindo as antocianinas que são amplamente encontradas e são os responsáveis, na maioria das vezes, pela coloração de pétalas, frutos e das folhas no outono (LEA; LEEGOOD, 1993).

Flavonoides são metabólitos secundários polifenólicos das plantas e apresentam um esqueleto de carbonos  $C_6 - C_3 - C_6$ , formando um núcleo fundamental benzo- $\gamma$ -pirano, também denominado de cromano, ao qual está ligado um anel aromático, formando o 2-fenil-benzo- $\gamma$ -pirano (COSTA, 1986; ROBBERS *et al.*, 1997; CROZIER, 2000). Os três anéis presentes na composição dos flavonoides, foram convencionados como A, B e C. A numeração destes núcleos é realizada com números ordinários, sendo para o anel B acompanhados de uma linha ( ' ) (ZUANAZZI, 2001). O segundo anel aromático B pode estar também nas posições 3 e 4 (ROBBERS *et al.*, 1997).

A Figura 3 representa o núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.

São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, originados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (CROZIER, 2000; ZUANAZZI, 2001), em uma mistura das vias acetato-chiquimato (MANN, 1999).

Os flavonoides podem estar numa forma livre (também denominada de aglicona ou genina) ou como heterosídeos (glicosídeos) (ZUANAZZI, 2001). Na forma heterosídica podem ocorrer como C-glicosídeos (glicosídeo ligado diretamente a um carbono) ou O-glicosídeos (glicosídeo ligado na forma de éter) que correspondem à maioria destes compostos. Associações com glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose são mais comumente observadas nos flavonoides glicosídicos (ROBBERS *et al.*, 1997). Geralmente a glicosilação é feita no C-3, mas pode também ser no C-5 e C-7 do anel A, enquanto que flavonoides glicosilados no anel B são raros (STRACK, 1997). Podem também ser encontrados como derivados acilados, metilados, sulfatados ou prenilados (ROBBERS *et al.*, 1997). Também são conhecidos os biflavonoides que são compostos diméricos (EVANS, 1992).

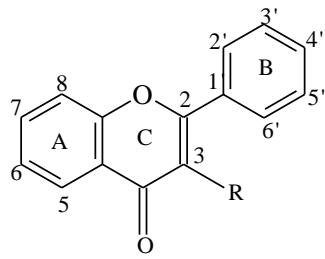


Fonte: Adaptado de MANN (1999); ZUANAZZI (2001).

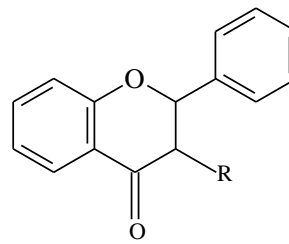
### FIGURA 3 - FÓRMULA GERAL DOS FLAVONOIDES

As principais categorias estruturais gerais dos flavonoides são as flavonas, as flavanonas, os flavonóis, os di-hidro-flavonóis, as chalconas, as di-hidro-chalconas, as catequinas, as antocianidinas, as leucoantocianidinas, as isoflavonas, isoflavanonas, neoflavonas e auronas (STRACK, 1997; MANN, 1999; ZUANAZZI, 2001), que estão relacionadas na Figura 4. Nas auronas, o anel heterocíclico de seis membros é substituído por um anel de cinco membros, enquanto que nas chalconas aparece numa forma isomérica de cadeia aberta (ROBBERS *et al.*, 1997).

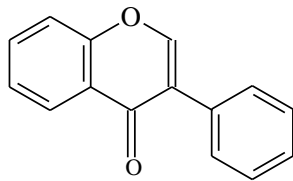




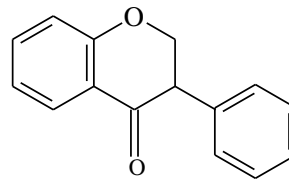
R = H = Flavona  
R = OH = Flavonol



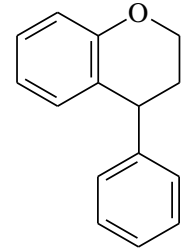
R = H = Flavanona  
R = OH = Di-hidro-flavonol  
(Flavanonol)



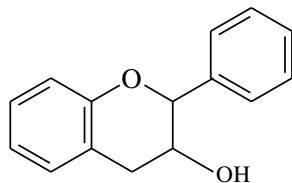
Isoflavona



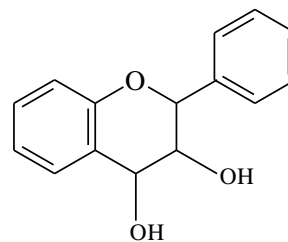
Isoflavanona



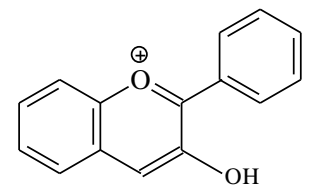
Neoflavona



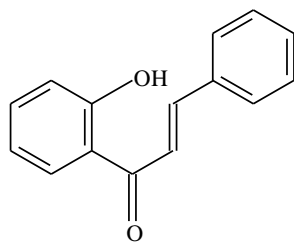
Catequina



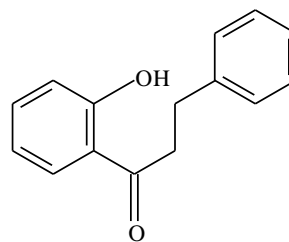
Leucoantocianidina



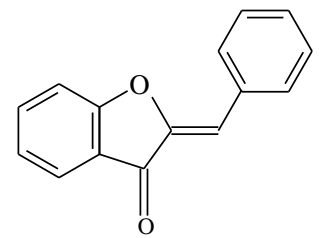
Antocianidina



Chalcona



Di-hidro-chalcona



Aurona

Fonte: Adaptado de STRACK (1997); MANN (1999); ZUANAZZI (2001).

FIGURA 4 - PRINCIPAIS CATEGORIAS DE FLAVONOIDES

### 3.3.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

A determinação do conteúdo de compostos polifenólicos é comumente realizada empregando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, em meio alcalino, a óxidos de tungstênio e molibdênio, pelos compostos fenólicos presentes no material analisado, formando um complexo de coloração azul, que apresenta absorção máxima em 760 nm (KUJALA *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2005; MEDA *et al.*, 2005).

## 3.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

### 3.4.1 Aspectos gerais da atividade antibacteriana:

A busca por substâncias que atuem como novos agentes antimicrobianos tem sido objeto de inúmeras pesquisas, uma vez que desde a última década tem sido verificado um aumento da incidência de patógenos resistentes às drogas atualmente disponíveis (SUTCLIFFE, 2003).

Os produtos naturais de origem vegetal por apresentarem uma diversidade de estruturas moleculares têm se mostrado eficientes contra as mais variadas espécies microbianas (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar extratos e frações obtidos de uma variedade de espécies vegetais com potencial ação antimicrobiana, bem como para isolar e elucidar a estrutura das substâncias envolvidas nesta atividade (LIMA, 2001).

Diversos metabólitos secundários das plantas apresentam atividade antimicrobiana, sendo os alcaloides, compostos fenólicos (flavonoides, taninos,

cumarinas) e terpenoides os mais comumente relacionados com esta ação (LIMA, 2001).

Para a uniformização da triagem da atividade antimicrobiana de materiais obtidos de fontes vegetais, RIOS e RECIO (2005) propuseram como métodos padrão a difusão, a bioautografia e a macro ou microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima.

A aplicação destas diferentes técnicas é necessária devido à presença de substâncias químicas diversas nestes materiais e que podem ser avaliadas melhor em uma técnica do que em outra. Nas técnicas que envolvem difusão, extratos, frações e substâncias mais apolares podem apresentar-se falsamente inativos como antimicrobianos pela dificuldade de sua difusão no meio, como foi destacado por ALVES *et al.* (2008). O mesmo também pode ocorrer na bioautografia. Por outro lado, ocorrem situações em que não é observada ação quando a amostra é avaliada empregando metodologias de diluição, enquanto que os resultados possam ter sido promissores na difusão ou na bioautografia.

No método da difusão, o material a ser avaliado é colocado em contato com um meio de cultura sólido em que foi inoculado um determinado microorganismo e após incubação por 24 horas a 35-37 °C é relacionado o tamanho da zona de inibição de crescimento deste microorganismo. A zona de crescimento é medida e comparada com a apresentada por um padrão biológico de referência (controle positivo). As técnicas para aplicação do material vegetal no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar, detalhadas no trabalho de revisão realizado por OSTROSKY *et al.* (2008). Uma limitação deste método é que ele se restringe a avaliação de microorganismos aeróbicos ou aeróbicos facultativos de crescimento rápido (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A bioautografia é um estudo qualitativo (inibição ou não do crescimento microbiano). Está fundamentada na verificação de zonas de inibição do crescimento microbiano apresentada pelo material que foi aplicado em uma placa de cromatografia em camada delgada adicionada a um meio de cultura no qual foi inoculada a cepa em estudo (CUNICO *et al.*, 2007).

O método da diluição em caldo relaciona o crescimento microbiano em um meio de cultura líquido, verificado pela turbidez do meio, com a concentração do

material ensaiado, utilizando também um padrão de referência como controle positivo, bem como controles negativos nesta comparação. Permite avaliações quantitativas, possibilitando a verificação da concentração inibitória mínima, ou seja, o teor mínimo do material ensaiado que inibe o crescimento microbiano, representado pela ausência de turvação no meio. Pode ser avaliado através das técnicas de micro ou de de macrodiluição, apresentadas no trabalho de revisão de OSTROSKY *et al.* (2008). Ainda que não seja influenciado pela velocidade de crescimento do microorganismo, pode detectar produtos resultantes de contaminação, principalmente quando for referente a materiais clínicos.

#### 3.4.2 Atividade antibacteriana no gênero *Acacia*:

Atividade antibacteriana contra uma variedade de microorganismos patogênicos foi verificada com diversas espécies de *Acacia*, conforme foi demonstrado anteriormente.

A análise da atividade antibacteriana das flores de *Acacia podalyriifolia*, realizada por ANDRADE *et al.* (2005), demonstrou que houve inibição do crescimento de *Staphylococcus epidermidis* perante o extrato etanólico bruto e as frações diclorometano e acetato de etila. Também foram observadas zonas de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* frente ao extrato etanólico bruto e à fração acetato de etila. Não foi observada ação destes extratos ou frações sobre as cepas gram-negativas avaliadas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Nestes ensaios, a fração acetato de etila demonstrou ser a mais ativa, possuindo em sua composição química majoritária substâncias fenólicas flavonoídicas, para as quais tem sido relatada atividade antibacteriana (EVANS, 1992; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; ZUANAZZI, 2001). Substâncias flavonoídicas foram consideradas também responsáveis pela ação antimicrobiana observada por KHAN e colaboradores (1980) com os extratos alcoólicos de *Acacia nilotica* e por CHATTI *et al.* (2009) em diversos extratos de *Acacia salicina*.

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1 Aspectos gerais

Radicais livres são espécies químicas, geralmente muito reativas, que apresentam elétrons desemparelhados (CENGIZ; YÜKSEL; SEVEN, 1999; YORBIK *et al.*, 2002). Podem ser gerados durante o metabolismo normal das células (durante a respiração aeróbica, nos processos inflamatórios, na regulação do crescimento celular, na síntese de substâncias, dentre outros), como também podem ser provenientes de agentes externos como o tabaco, certos poluentes, solventes orgânicos, pesticidas, ou ser produzidos por radiações ionizantes e luz ultravioleta (LIU; NG, 1999; GÜLCIN *et al.*, 2003).

As espécies reativas ou ativas formadas nos sistemas biológicos incluem radicais do oxigênio (denominados de “espécies reativas de oxigênio” - ERO), radicais do nitrogênio (denominados de “espécies reativas de nitrogênio” - ERN), como também radicais derivados de tióis ( $RS^{\cdot}$ ), espécies reativas de cloro e de carbono, complexos com metais de transição e outros íons metálicos, bem como espécies não-radicalares que podem ser facilmente convertidas em radical (CHEESEMAN; SLATER, 1996; GÜLCIN *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Nas espécies reativas de oxigênio (ERO) estão incluídos os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), o radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), o radical alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ), e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (GYAMFI; YONAMINE; ANIYA, 1999; GÓTH; VITAI, 2003; GÜLCIN *et al.*, 2003; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A produção de ERO é favorecida pelos íons ferro e cobre. Para o transporte e estocagem destes metais existe um complexo sistema, prevenindo ou minimizando as reações de oxidação por estes catalisadas (ANDERSON; PHILLIPS, 1999; KOURY; DONANGELO, 2003). Ferro é transportado e armazenado ligado com proteínas específicas como a transferrina, ferritina e lactoferrina. Ceruloplasmina e albumina sérica ligam-se com os íons cobre (ANDERSON; PHILLIPS, 1999).

Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERN), tem-se o óxido nítrico (NO), o óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ). Ainda que o radical óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) não seja suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, pode reagir com o radical  $O_2\cdot$  formando peroxinitritos ( $ONOO\cdot$ ), que ao sofrerem reações secundárias, formam agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases nitrogenadas do DNA, especialmente a guanina (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Estas espécies reativas podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, desordens respiratórias, doenças neurodegenerativas, diabetes melitus, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (ANDERSON; PHILLIPS, 1999; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2000; AL-MAMARY *et al.*, 2002; YORBIK *et al.*, 2002, GÜLCIN *et al.*, 2003; CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005).

Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares são muito suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio, ocasionando a peroxidação lipídica, que é bastante lesiva por ser uma reação de auto-propagação na membrana (KOURY; DONANGELO, 2003).

Para inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas, os organismos vivos possuem mecanismos de defesa próprios, como certas variedades de enzimas, dentre as quais a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, além das substâncias antioxidantes provenientes da dieta, como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ubiquinol,  $\beta$ -caroteno, compostos fenólicos diversos, flavonoides, dentre outras (AL-MAMARY *et al.*, 2002; YORBIK *et al.*, 2002; JURKOVIC *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003).

Em HALLIWELL e GUTTERIDGE (1999) antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em concentrações bem mais baixas que os substratos oxidáveis, retardam ou previnem significativamente a oxidação destes ao atuarem cataliticamente captando, suprimindo estados excitados, neutralizando ou removendo

os radicais livres e outras espécies reativas, ou ainda, ao promoverem a ligação dos íons metálicos e outros agentes prooxidantes às proteínas, indisponibilizando-os para a produção de espécies oxidantes.

Em condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre a geração das espécies reativas e a sua inativação pelos sistemas antioxidantes, protegendo o organismo dos efeitos deletérios destes. Defesas antioxidantes inadequadas ou excesso de produção destas espécies reativas resultam no processo denominado de estresse oxidativo (DRAI *et al.*, 2001; GÜLCIN *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O enriquecimento da ingestão de substâncias antioxidantes, identificadas como removedores destas espécies reativas, desempenha um importante papel de proteção do corpo humano contra os danos que estes agentes ocasionam, bem como retardam o aparecimento de muitas doenças crônicas (GÜLCIN *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Sendo assim, tem aumentado o interesse e a procura por antioxidantes naturais, obtidos a partir das plantas, para uso tanto para as indústrias farmacêuticas, como também alimentícias e cosméticas (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

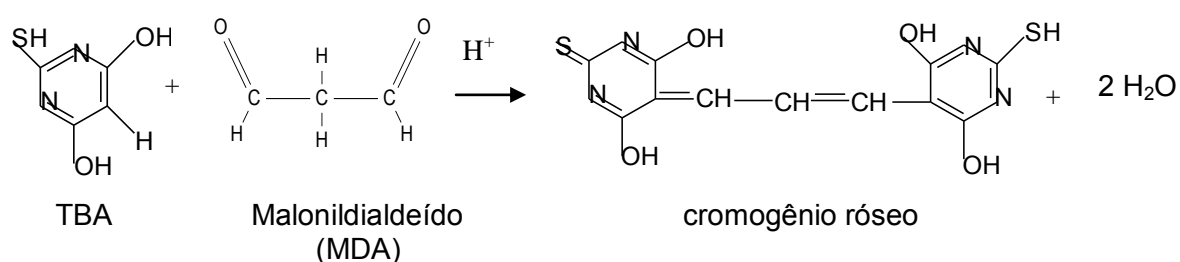
A atividade antioxidante de uma substância não pode ser aferida diretamente, sendo necessária a avaliação de seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado. Estes métodos usam, na maioria das vezes, processos oxidativos, envolvendo uma fonte de radicais livres específica e a adição de um agente iniciador, que acelera o processo, podendo ser a agitação, a temperatura, uma pressão parcial de oxigênio, um metal de transição ou mesmo exposição à luz. Sob condições padronizadas, estes radicais são oxidados e a extensão da oxidação é medida (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Os trabalhos de revisão de SÁNCHEZ-MORENO (2002), HUANG, OU E PRIOR (2005) e VASCONCELOS *et al.* (2006) apresentam a necessidade de emprego de vários métodos, com substratos e reagentes diferenciados, nos testes *in vitro* de triagem, para se avaliar a efetividade antioxidante de amostras, por apresentarem diferentes mecanismos de ação.





As espécies reativas promovem uma cascata de reações que geram a peroxidação lipídica, resultando na produção de substâncias como o malonildialdeído (MDA) (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os ensaios utilizando as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) mensuram o ponto final do dano oxidativo, sendo úteis para avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido e da proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes no material analisado (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005). Estes testes permitem a mensuração da peroxidação lipídica de matrizes biológicas ao promover a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA, em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, gerando um cromóforo róseo que pode ser medido espectrometricamente em 532 nm, (MIYATA, SMITH, 1996; KELLER *et al.*, 2000; DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005). A reação que ocorre, adaptada de OSAWA, FELICIO; GONÇALVES (2005), está demonstrada a seguir:



### 3.5.2 Atividade antioxidante no gênero *Acacia*:

Ação antioxidante foi observada para diferentes espécies no gênero *Acacia*, como está demonstrado na Tabela 2. Extratos de *A. catechu* (PARK; BOO, 1991; NAIK *et al.*, 2003), *A. confusa* (CHANG *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005), *A. nilotica* (SALEEM *et al.*, 2001) e *A. pennata* (THALANG *et al.*, 2001) apresentavam efeitos antioxidantes devido à presença de substâncias polifenólicas, como flavonoides e taninos. Mel obtido de *A. ehrenbergina* (AL-MAMARY *et al.*, 2002) e de outras espécies de *Acacia* (MEDA *et al.*, 2005), apresentou elevado potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos. Extratos e compostos flavonoídicos obtidos de *A. mangium* e *A. auriculiformis* demonstraram intensa atividade sequestrante de radicais

livres (MIHARA *et al.*, 2005). Até o momento, não haviam sido encontrados relatos de avaliação da ação antioxidante em *Acacia podalyriifolia*.

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonoides e ácidos fenólicos, apresentam destaque especial como eficientes removedores de radicais peroxila, além de reduzir e quelar íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (AL-MAMARY *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2003; RAMIREZ-MARES; MEJIA, 2003).

O estudo fitoquímico das flores de *Acacia podalyriifolia*, demonstrado por ANDRADE (2003 a), registrou a presença desta categoria de substâncias, tornando relevante a avaliação do seu potencial antioxidante na prevenção do estresse oxidativo.

### 3.6 ENSAIO DE TOXICIDADE GERAL PELA *Artemia salina*

#### 3.6.1 Aspectos gerais:

A quimioterapia com drogas citotóxicas tem sido utilizada com frequência cada vez maior como coadjuvante da cirurgia ou da irradiação em diversos tipos comuns de tumores (RANG; DALE, 1993). Deve haver a erradicação plena da população de células neoplásicas para que se obtenha sucesso na terapia, quer seja por meio da quimioterapia, como por outras formas de tratamento (como a excisão total do tumor para obter a cura cirúrgica ou a destruição completa de todas as células cancerosas para obter cura na radioterapia) (GILMAN *et al.*, 1991).

A atuação da maioria das drogas citotóxicas ocorre em fases específicas do ciclo celular, exercendo sua atividade contra as células que se encontram em processo de divisão. Sendo assim, são mais suscetíveis ao tratamento quimioterápico as neoplasias malignas que apresentam um crescimento rápido, enquanto que tumores de crescimento lento, como os tumores de pulmão e de cólon, geralmente não respondem adequadamente às drogas citotóxicas (GILMAN *et al.*, 1991; GOMES;

MILANEZ, 1997). Os tecidos normais que também apresentem crescimento rápido, como a medula óssea, os folículos pilosos, o epitélio intestinal, dentre outros, estão sujeitos a sofrerem danos por estes agentes antitumorais, advindo problemas como mielotoxicidade, cicatrização deficiente, depressão do crescimento, esterilidade, teratogeneidade, perda de cabelos, além de conduzirem a náuseas e vômitos (GILMAN *et al.*, 1991; RANG; DALE, 1993).

As células tumorais podem apresentar-se resistentes às drogas citotóxicas, podendo ser uma resistência primária (presente quando o fármaco é administrado pela primeira vez) ou adquirida (desenvolve-se durante o tratamento com um determinado fármaco). A resistência adquirida pode resultar de uma mutação ou de adaptação das células tumorais, surgindo células que são afetadas em menor grau ou que não são afetadas pela droga (RANG; DALE, 1993). A compreensão desta resistência é muito importante na pesquisa de novas substâncias citotóxicas e na elaboração de esquemas de tratamento mais eficientes (GILMAN *et al.*, 1991).

Neste sentido torna-se essencial a pesquisa de novas drogas antineoplásicas que apresentem compostos capazes de escapar dos mecanismos específicos de resistência e apresentem atividade contra as células tumorais resistentes (GILMAN *et al.*, 1991).

A pesquisa de novos agentes antitumorais tem sido vastamente investigada, tanto pela resistência que muitos tumores apresentam aos tratamentos disponíveis, quanto pelos efeitos tóxicos das drogas disponíveis. Resultados promissores têm sido obtidos com compostos extraídos de fontes naturais (POPOCA *et al.*, 1998; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Modelos de triagem da citotoxicidade representam uma importante fonte de dados preliminares para a seleção de extratos de plantas com potenciais propriedades antineoplásicas (POPOCA *et al.*, 1998).

A utilização do teste com a *Artemia salina* Leach (camarão marinho) para a investigação de atividade biológica dos extratos e de substâncias naturais isoladas destas plantas é uma importante ferramenta para o estabelecimento da toxicidade geral e dos parâmetros de citotoxicidade (MEYER *et al.* 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2009).

Diversos pesquisadores que atuam no desenvolvimento de novas drogas antitumorais obtidas de produtos naturais têm demonstrado correlações positivas entre a letalidade da *Artemia salina* frente a estes produtos e a citotoxicidade, sendo inclusive esta técnica recomendada como um efetivo ensaio preliminar para avaliar a citotoxicidade e atividades antitumorais, que demandam maior tempo e recursos financeiros para a sua realização (MEYER *et al.*, 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000).

### 3.6.2 Citotoxicidade no gênero *Acacia*:

Citotoxicidade tem sido reportada para diferentes espécies de *Acacia*. Taninos isolados da *A. ixiophylla* e *A. decurrens* apresentaram atividade antitumoral em ratos e camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 1972). Extratos das cascas de *A. pennatula* demonstraram-se moderadamente ativos (POPOCA *et al.*, 1998). O extrato etanólico e a apigenina-C-glicosilada obtidos de *A. laeta* apresentaram moderada atividade anticâncer (NASSAR, 1999). Saponinas triterpenoídicas obtidas de *A. victoriae* inibiram o crescimento de células tumorais (HARIDAS *et al.*, 2001). A presença de substâncias flavonídicas verificada em diversos extratos de *Acacia salicina* estavam associadas à citotoxicidade apresentada por estes materiais (CHATTI *et al.*, 2009).

Compostos fenólicos são reconhecidos como detentores de importante ação no decréscimo de células tumorais (PAKULSKI; BUDZIANOWSKI, 1996; FAJARDO *et al.*, 2000; FEMIA *et al.*, 2001; SOLEAS *et al.*, 2002). A presença destes compostos foi verificada no estudo fitoquímico das flores de *Acacia podalyriifolia* (ANDRADE, 2003), justificando a avaliação desta atividade na citada espécie.

### 3.7 AÇÃO ALELOPÁTICA

#### 3.7.1 Alelopatia: características gerais

Alelopatia está relacionada à capacidade de uma planta interferir na germinação de sementes e/ou no crescimento de outras espécies vegetais, prejudicando ou favorecendo o seu desenvolvimento, por meio de substâncias aleloquímicas, liberadas na atmosfera ou no solo (MEDEIROS, 1990).

Diferentes grupamentos químicos como ácidos fenólicos, cumarinas, terpenoides, flavonoides, alcaloides, taninos, quinonas complexas, podem ser responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados nas plantas (EINHELLIG, 1986; MEDEIROS, 1990).

Desde 1960 a presença dos aleloquímicos é reconhecida como um importante mecanismo ecológico que pode provocar influências significativas no manejo agrícola ou florestal: na dominação de certas espécies vegetais; na sucessão dos plantios e na rotação dos cultivos, podendo favorecer ou prejudicar o desenvolvimento de um determinado produto agrícola, com efeitos na produtividade (CHOU, 1986; FERREIRA; AQUILA, 2000). A partir de 1980 ocorreu um grande aumento nas pesquisas sobre a alelopatia, com inúmeras publicações e referências na maioria dos países do mundo, sendo considerada uma ciência prioritária nos países desenvolvidos (MALHEIROS; PERES, 2001).

Substâncias biologicamente ativas obtidas das plantas já estão sendo usadas no controle de ervas daninhas, muitas das quais apresentavam resistência a várias categorias de herbicidas usualmente empregados; de insetos e de microorganismos patogênicos. Assim, podem se constituir em uma alternativa ao uso dos defensivos agrícolas, sem efeitos adversos ao meio ambiente, mantendo um melhor equilíbrio do ecossistema e com menores custos (RIZVI; RIZVI, 1992; CHOU, 1998; MEERA; CHANDER; KALIDHAR, 2005).

### 3.7.2 Atividade alelopática no gênero *Acacia*:

Muitas espécies de *Acacia* apresentaram ação alelopática, como foi demonstrado anteriormente.

A avaliação do potencial alelopático das flores de *Acacia podalyriifolia*, realizada por ANDRADE *et al.* (2003 b) com o extrato etanólico bruto e as frações diclorometano e acetato de etila das suas flores, demonstrou que houve efeitos na germinação e no crescimento radicular e caulicular de *Lactuca sativa*, sugerindo a presença de aleloquímicos. Efeito alelopático significativo foi verificado com as frações acetato de etila e diclorometano, possivelmente devido à presença de substâncias fenólicas como os flavonoides, detectadas na triagem fitoquímica. Tanto as folhas como as substâncias isoladas desta espécie ainda não haviam sido avaliadas quanto ao seu potencial alelopático.

A avaliação do potencial alelopático de *Acacia podalyriifolia* poderá possibilitar sua aplicação direta na obtenção de matéria-prima vegetal para a produção de fitoterápicos, isenta de resíduos de herbicidas e agrotóxicos de origem sintética que não são permitidos para uso no Brasil no cultivo de plantas medicinais (CAETANO; FONTE; BORSATO, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don foram colhidas do Jardim Botânico, no município de Curitiba (Paraná), entre os meses de Junho a Agosto de 2005, enquanto que as folhas foram coletadas do mesmo local em dezembro de 2008. A classificação da espécie foi realizada pelo botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba. Uma amostra do material se encontra depositada no herbário do museu, catalogada e registrada sob o nº. 285767.

### 4.2 CONSERVAÇÃO

Tanto as flores quanto as folhas foram secas à sombra, à temperatura ambiente, por uma semana. Cada material vegetal foi então triturado, separadamente, em moinho de facas e acondicionado em sacos de papel, devidamente fechados, ao abrigo da luz e da umidade.

### 4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

#### 4.3.1 Obtenção do extrato etanólico

Inicialmente foi realizado o processamento de 150 g de flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, previamente secas, utilizando extração em Soxhlet, com etanol comercial. A este mesmo tratamento foram submetidas 150 g de folhas desta planta. Os extratos assim obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, com aquecimento em banho-maria à temperatura não superior a 50 °C, até um volume de aproximadamente 300 mL. Estes foram então armazenados em geladeira durante uma noite e no dia seguinte centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm, sendo os sobrenadantes rotulados como extrato etanólico (EE

FLOR para as flores e EE FOL para as folhas) e os precipitados foram denominados de resíduos (RES FLOR para as flores e RES FOL para as flores). Uma alíquota de 20 mL de cada extrato etanólico foram reservados para a execução de ensaios de atividade biológica.

#### 4.3.2 Fracionamento do extrato etanólico

Após a centrifugação, cada extrato etanólico foi particionado em aparelho Soxhlet modificado, utilizando solventes de polaridade crescente. A base deste extrator sofreu um alargamento de forma a evitar o sifonamento do extrato e permitindo assim a passagem do solvente mais denso através da fase hidroalcoólica, conforme foi descrito por CARVALHO (2001; 2008) e CARVALHO *et al.* (2009). O tempo para a extração foi de aproximadamente 8 horas para cada um dos solventes.

Os extratos etanólicos foram particionados inicialmente com hexano P.A. para a retirada de substâncias mais apolares. As frações hexânicas assim obtidas foram conduzidas à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura não superior a 50°C, correspondendo à fração hexânica FHEX FLOR para as flores e FHEX FOL para as folhas.

Aos extratos etanólicos restantes foi adicionada água destilada em quantidade suficiente para obter-se 500 mL de extrato hidroalcoólico, para que então pudesse ser particionado com diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) P.A. As frações diclorometano (FDCM FLOR e FDCM FOL) assim obtidas foram concentradas à secura, em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria à temperatura não superior a 40°C.

As frações hidroalcoólicas remanescentes foram então extraídas com acetato de etila P.A. Em seguida, foram também conduzidas à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura não superior a 50°C, correspondendo às frações acetato de etila (FAE FLOR e FAE FOL).

O fracionamento do extrato etanólico está demonstrado na Figura 5.



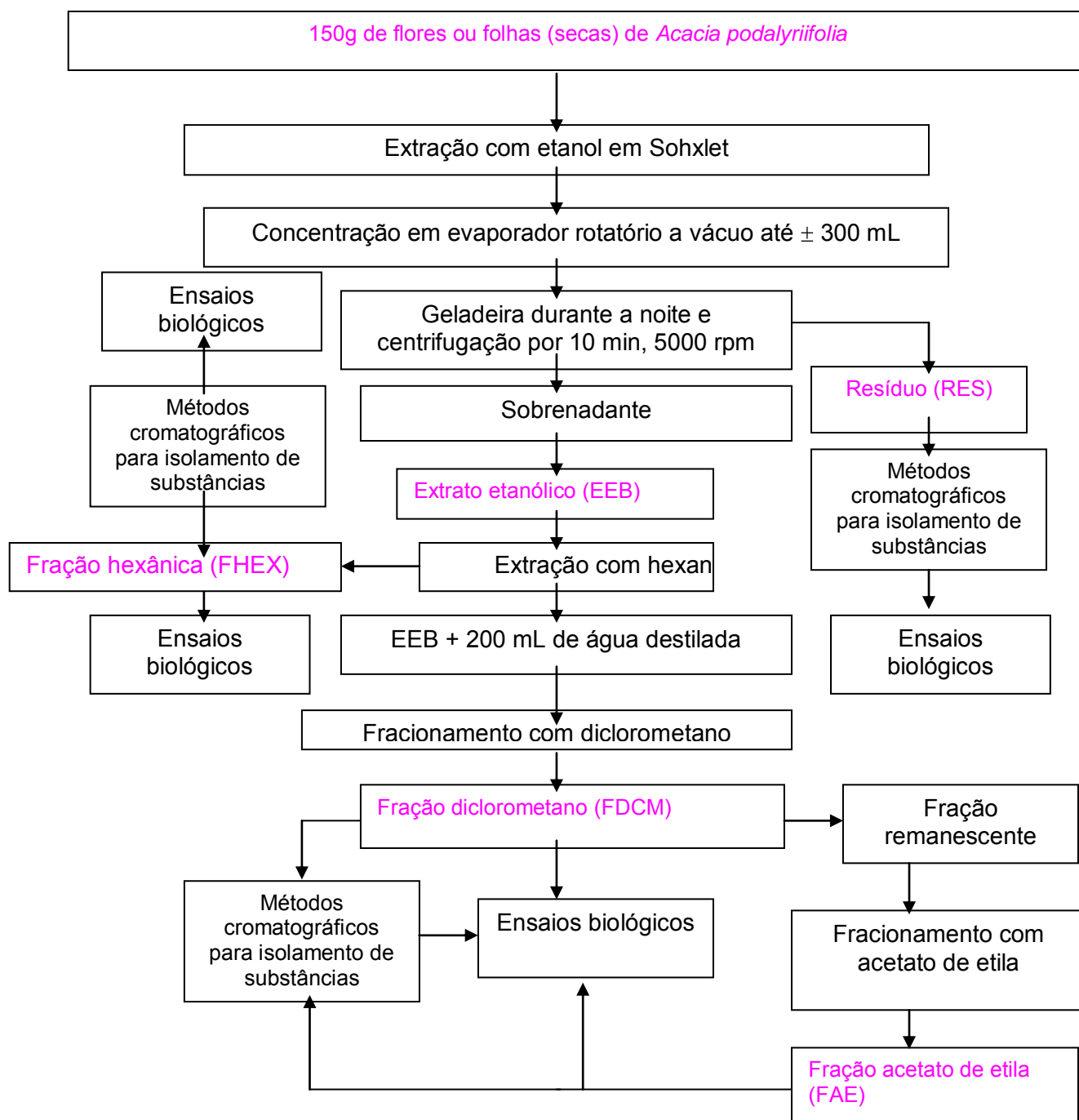


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

### 4.3.3 Pesquisa de grupos fitoquímicos nos extratos e frações

A triagem fitoquímica das flores e das folhas consistiu na pesquisa de alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, cumarinas, tanoides, quinonas, glicosídeos cianogenéticos, saponinas e esteroides/triterpenoides, utilizando a sistemática descrita em MOREIRA (1979).

### 4.3.4 Isolamento de substâncias do resíduo do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e das folhas.

O resíduo do extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e das folhas foram estudadas cromatograficamente para o isolamento, identificação e quantificação dos componentes majoritários. Os métodos utilizados foram desenvolvidos em laboratório de acordo com as características encontradas nos diferentes extratos e frações analisados.

O isolamento foi efetuado através de métodos cromatográficos clássicos, utilizando colunas de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck e/ou CCD preparativa (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck).

#### 4.3.4.1 Fração Hexânica

##### 4.3.4.1.1 Fração hexânica das flores

Foi confeccionada uma pastilha com silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck e 3 g da fração hexânica obtida das flores e o material resultante foi submetido à cromatografia em coluna (17 X 4,5 cm), utilizando 28 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck. O fracionamento foi realizado utilizando como sistema eluente 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente inicial de polaridade até 100% de acetato de etila. As mudanças de solvente foram de 5 em 5%, em volumes de 50 mL cada. Em seguida foi realizado processo semelhante empregando acetato de etila e metanol, também em gradientes crescentes de polaridade até ter-se 60% em

metanol, para então o gradiente ser alterado para 100% de metanol. Foram coletadas 150 frações com aproximadamente 10 mL cada, assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de lâmpada de UV. Houve cristalização nas frações 1 a 13, denominado de FHEXFLOL 1.

A Figura 6 representa o fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados com a fração hexânica.

#### 4.3.4.1.2 Fração hexânica das folhas

Processo semelhante foi realizado com a fração hexânica das folhas (2,5 g), utilizando a mesma quantidade de silicagel e o mesmo sistema eluente. Foram obtidas 158 frações. Houve cristalização nas frações 1 a 10, denominada de FHEXFOL1.

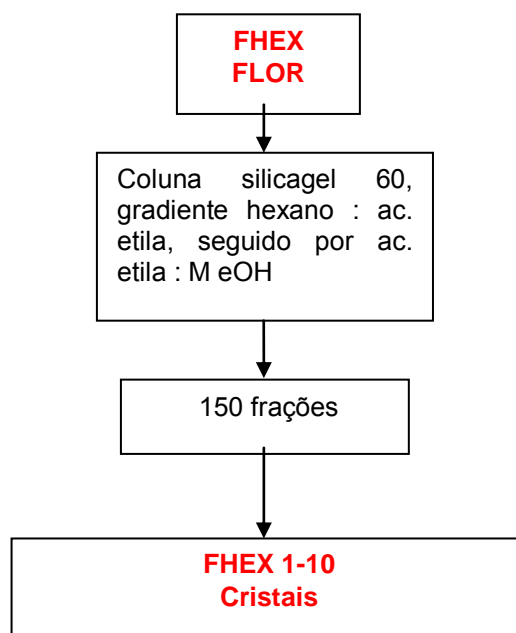


FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FLORES (FHEX FLOR)

#### 4.3.4.2 Fração diclorometano

##### 4.3.4.2.1 Fração diclorometano das flores

Com 500 mg da fração diclorometano das flores foi preparada uma pastilha com silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck e submetida à separação cromatográfica em coluna (30 X 3 cm) contendo 40 g de silicagel (Figura 7).

O sistema eluente utilizado foi o mesmo descrito para a fração hexânica nos mesmos gradientes crescentes de polaridade, utilizando hexano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 130 frações com aproximadamente 10 mL cada, assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de lâmpada de UV.

A análise destas frações por CCD, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (90:10) e clorofórmio:metanol (90:10), indicou a presença de cristais nas frações 10 a 18 (hexano:acetato de etila 70:30), 19 a 39 (hexano:acetato de etila 50:50, acetato de etila 100% e acetato de etila:metanol, gradientes a 5 e 10%) e 40 a 100 (acetato de etila:metanol, gradientes a 10, 15 e 20%).

As frações 10 a 18 foram reunidas utilizando como solvente clorofórmio: metanol 50:50, conduzidas à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando em 315 mg. Após ser submetido à CCD analítica utilizando cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck e como fase móvel clorofórmio: metanol 95:5, foi verificada a presença de 2 compostos cujos R<sub>f</sub> eram muito próximos, dificultando o processo de separação. Na tentativa da sua separação, este material foi submetido à CCD preparativa, utilizando cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck e como fase móvel clorofórmio: metanol 95:5. Após a corrida e subsequente evaporação da fase móvel, foram observadas 3 faixas ao longo da CCD preparativa e a sílica raspada nas áreas correspondentes. Às subfrações do material com a sílica foram adicionados clorofórmio: metanol 50:50 e a seguir submetidos à filtração em funil de vidro sinterizado G3. Após a evaporação do solvente, foram observados cristais na subfração 2 (denominado de FDCM 10), porém não se encontravam puros e não foi possível sua purificação pelos métodos cromatográficos testados.

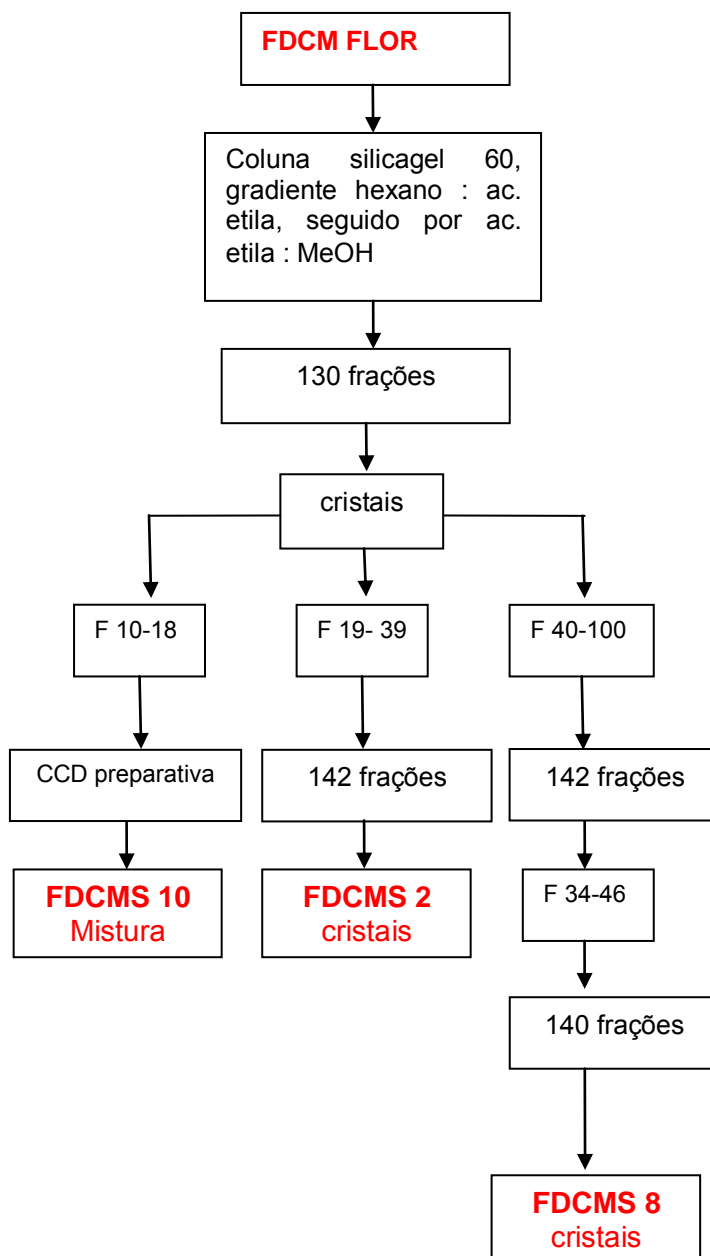


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FDCM DAS FLORES

As frações 19 a 39 foram reunidas utilizando como solvente clorofórmio: metanol 50:50, conduzidas à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando em 140 mg que foram eluídos em coluna (17 X 4,5 cm) contendo 28 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck, utilizando o mesmo sistema eluente citado anteriormente. Foram coletadas 130 frações com aproximadamente 20 mL cada,

assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de lâmpada de UV. Foi verificada a presença de cristais nas frações 2 a 4 (hexano:acetato de etila 65:30 a 50:50), denominado de substância FDCMS 2.

As frações 40 a 100 foram também reunidas como descrito para as outras frações anteriores, resultando em 340 mg. Utilizando 320 mg desta fração foi preparada uma pastilha com silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck, que foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (30 X 3 cm) contendo 30 g desta mesma sílica e submetido ao mesmo sistema eluente, em volumes de 100 mL cada (exceto para os gradientes a 10 e 15% de metanol em acetato de etila, no qual foram utilizados 200 mL). Foram coletadas 142 frações com aproximadamente 12 mL cada, assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de lâmpada de UV. Foi verificada a presença de cristais nas frações 34 a 46 (201 mg), porém como havia mistura de compostos, verificado ao realizar CCD analítica utilizando cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck e fase móvel clorofórmio: metanol (90:10), este foi submetido à nova separação cromatográfica em coluna, semelhante à aplicada inicialmente. Das 140 frações coletadas, foi verificada a presença de cristais nas frações F8 a 18, denominados de FDCMS 8.

#### 4.3.4.2.2 Fração diclorometano das folhas

Foi preparada uma pastilha com silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck e 500 mg da fração diclorometano das folhas e submetida à separação cromatográfica em coluna de silicagel, (17 X 4,5 cm), contendo 28 g de silicagel. Os gradientes de eluição foram os mesmos descritos para a fração diclorometano das flores.

Foram coletadas 128 frações, assim que o material começou a eluir. No entanto, não houve cristalização nestas frações obtidas por se constituir de uma mistura de compostos.

#### 4.3.4.3 Fração acetato de etila

Após armazenamento em congelador da fração acetato de etila obtida tanto das flores quanto das folhas, foi observada sedimentação de um material de coloração amarelada, denominado de FAES FLOR, para as flores e FAES FOL para as folhas. A fração acetato de etila remanescente das flores (FAER FLOR) e das folhas (FAER FOL) e o sedimento das flores (FAES FLOR) foram submetidos à cromatografia em coluna.

##### 4.3.4.3.1 Fração acetato de etila remanescente das flores (FAER FLOR)

Inicialmente a fração acetato de etila remanescente das flores foi analisada por CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck). Foram testadas as fases móveis CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5 e 90:10) e acetato de etila:água:ácido fórmico (98,5:1,0:0,5 e 90:5:5), demonstrando ser estas últimas as mais indicadas, possibilitando a observação de diversas manchas indicativas de grupos cromóforos com intensa absorção no UV a 360 nm, com alteração ou intensificação da fluorescência pela revelação com nebulização de solução de hidróxido de sódio concentrada e com reativo de NEU (difetilboriloxietilamino a 1% em metanol), característico de presença de substâncias fenólicas e flavonoídicas, segundo metodologia descrita por CARVALHO (2008).

Foi realizada uma pastilha com silicagel e 5 g da fração acetato de etila remanescente, que foi submetida à cromatografia em coluna (30 X 3 cm), contendo 50 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck.

O sistema eluente utilizado iniciou com 100% de acetato de etila, seguido por gradientes de acetato de etila:água:ácido fórmico (98,5:1,0:0,5; 97:2:1; 95:3:2 e 90:5:5), e posterior gradientes de acetato de etila:metanol:água:ácido fórmico (85:5:5:5; 80:10:5:5; 75:15:5:5; 70:20:5:5) até 100% metanol, em volumes de 200 mL cada, tendo sido coletadas 170 frações com aproximadamente 10 mL cada, assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de lâmpada de UV a 360 nm. Houve cristalização nas frações 4 a 8 (denominado FAER 4) e 20 a 33 (denominado

de FAER 20), obtidos com os gradientes de acetato de etila:água:ácido fórmico 98,5:1:0,5 e 97:2:1.

#### 4.3.4.3.2 Fração acetato de etila sedimentada das flores (FAES FLOR)

O material que sedimentou quando a fração acetato de etila das flores foi armazenada no congelador (FAES FLOR) foi separado por filtração a vácuo, em funil de vidro sinterizado (G4) e lavado com hexano P.A. gelado, correspondendo a 208 mg. Com este material foi também realizada CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F254 Merck), utilizando acetato de etila:água:ácido fórmico 90:5:5 como fase móvel, revelada tanto com solução de hidróxido de sódio concentrada quanto com reativo de NEU. O material foi também submetido à cromatografia em coluna (65 X 1,8 cm), contendo 34 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck.

O sistema eluente foi o mesmo utilizado para a fração acetato de etila remanescente. Foram coletadas 150 frações com aproximadamente 10 mL cada, assim que o material começou a eluir, observado através de lâmpada de UV a 360 nm. Foi verificada cristalização nas frações 9 a 16, denominada de FAES 9, obtidas com os gradientes de acetato de etila:água:ácido fórmico 98:1:1 e 95:3:2.

A Figura 8 representa o fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados com a fração acetato de etila obtida das flores.



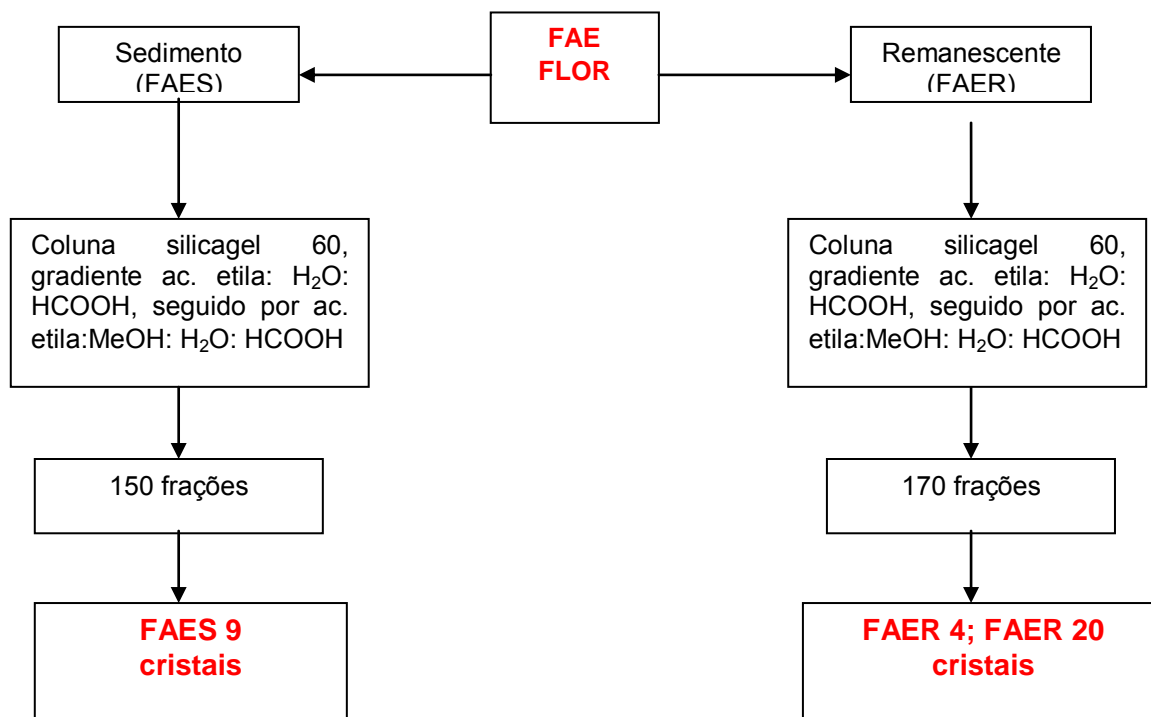


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES (FAE FLOR)

#### 4.3.4.3.3 Fração acetato de etila remanescente das folhas

A fração acetato de etila remanescente das folhas foi analisada por CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), segundo metodologia descrita para as flores.

Foi realizada uma pastilha com silicagel e 500 mg da fração acetato de etila remanescente das folhas, que foi submetida à cromatografia em coluna (17 X 4,5 cm), contendo 28 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck. O sistema eluente utilizado iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente inicial de polaridade até 100% de acetato de etila. As mudanças de solvente foram de 5 em 5%, em volumes de 50 mL cada. Em seguida foi realizado processo semelhante empregando agora acetato de etila e metanol, também em gradientes crescentes de polaridade até metanol 100%. Foram coletadas 127 frações com aproximadamente 10 mL cada, assim que o material começou a eluir, o que foi verificado através de

lâmpada de ultravioleta a 360 nm. Houve cristalização entre as frações 72 a 85, as quais foram reunidas após CCD analítica. Por demonstrar uma mistura de compostos de Rf próximos, este material foi submetido à CCD preparativa com cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck, utilizando acetato de etila:acetona:água (25:8:2) como fase móvel.

#### 4.3.4.3.4 Fração acetato de etila sedimentada das folhas (FAES FOL):

O material que precipitou quando a fração acetato de etila das folhas foi armazenado em congelador, foi separado por filtração a vácuo, em funil de vidro sinterizado (G4) e lavado com hexano P.A. gelado. Esta substância foi submetida à CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), utilizando as fases móveis acetato de etila:água:ácido fórmico (90:5:5) e clorofórmio:metanol (90:10).

#### 4.3.4.4 Resíduo do extrato etanólico

##### 4.3.4.4.1 Resíduo do extrato etanólico das flores:

O resíduo que precipitou do extrato etanólico das flores (15 g) foi submetido à cromatografia em coluna (30 X 3 cm), contendo 40 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck.

O sistema eluente utilizado foi similar ao descrito para a fração acetato de etila remanescente das folhas. Foram coletadas 39 frações com aproximadamente 12 mL cada. Foi verificada a precipitação de um material de coloração branca nas frações coletadas de 1 a 7, denominado de RES FLOR.

A Figura 9 representa o fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados com o resíduo.

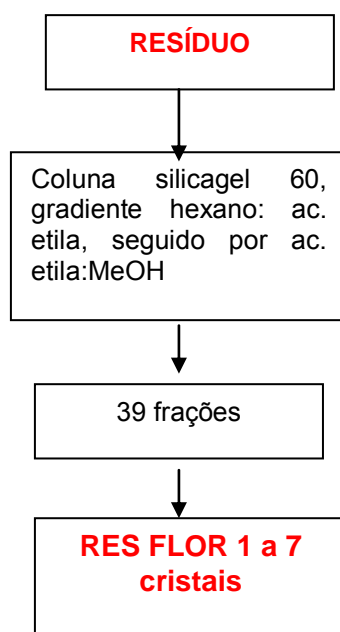


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DO RESÍDUO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES (RES)

#### 4.3.4.4.2 Resíduo do extrato etanólico das folhas:

Foram utilizados 7 g do resíduo que precipitou do extrato etanólico das folhas para serem submetidos à cromatografia em coluna (17 X 4,5 cm), contendo 28 g de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck. O sistema eluente foi o mesmo utilizado anteriormente. Foram obtidas 40 frações. Cristalização foi obtida nas frações 1 a 4, denominada de RESFOL.

#### 4.3.5 Identificação das substâncias isoladas das flores e das folhas das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e do resíduo do extrato etanólico:

Na determinação das estruturas das substâncias isoladas destas frações foram utilizados métodos espectroscópicos clássicos (UV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e IV), que foram comparados com os dados de literatura já descritos para estas substâncias, bem como determinação dos pontos de fusão. Para as substâncias heterosídicas foi realizada a hidrólise e a verificação do desvio da luz polarizada, utilizando polarímetro digital.

Para a avaliação por espectroscopia no ultravioleta/visível, as substâncias isoladas foram dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/100 mL e verificados os deslocamentos provocados nestas pelos reagentes diagnósticos (NaOMe, NaOAc, NaOAc /  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$  / HCl), segundo metodologia descrita em MABRY *et al.* (1970). Os espectros foram registrados em espectrofotômetro UV/visível UV 1601 PC Shimadzu, no intervalo entre 200 a 400 nm.

Para as espectroscopias de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  foram utilizadas de 7 a 15 mg das amostras, solubilizadas em metanol deuterado, dimetilsulfóxido (DMSO) ou clorofórmio deuterado, conforme a solubilidade das substâncias ou a disponibilidade do solvente e submetidas aos ensaios em equipamento Varian, na frequência de 300 e 75 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram fornecidos em ppm.

Nas análises por espectroscopia no infravermelho, foram realizadas pastilhas das amostras com brometo de potássio (previamente deixados em dessecador por 24 hs), sendo os espectros realizados em equipamento Bio-rad.

Hidrólises ácidas foram realizadas para as substâncias que se apresentassem como heterosídios para auxiliar na sua identificação.

A hidrólise foi realizada por duas metodologias: utilizando HCl 10% (ANDRADE, 2003) e TFA 4N (PASSOS, 2002). Segundo JUSTESEN e KNUTHSEN (2001), há possibilidade de não se conseguir uma hidrólise completa de alguns flavonoides glicosilados, verificada em exemplares de plantas, sugerindo a aplicação de metodologias diferenciadas para um melhor resultado deste processo.

Para a hidrólise utilizando ácido clorídrico, 3 mg da substância isolada obtida foram adicionados a 20 mL de HCl 10% e deixados sob refluxo por 30 minutos. Após este período a solução ácida foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, utilizando iso-propanol como fator de redução do ponto de ebulição da água, por formar um azeotrópo com a água em 73<sup>o</sup> C. O material resultante foi dissolvido em piridina para ser cromatografado.

Na hidrólise realizada com ácido trifluor acético (TFA) 4N, a 2 mg da substância analisada foi adicionado 0,5 mL de TFA 4 N e deixado em estufa a 95<sup>o</sup> C por 120 minutos, em frasco com a tampa bem vedada. Após este período, o frasco com o material hidrolisado foi submetido à centrifuga a vácuo para a evaporação do TFA, seguido pela realização de CCD analítica utilizando cromatofolha silicagel 60 F254, em fase móvel específica para as substâncias analisadas e os respectivos padrões, empregando orcinol (1%) em metanol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), com aquecimento, como revelador.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação do conteúdo de compostos polifenólicos, realizada para os extratos etanólicos (EE FLOR e EE FOL) e para as frações hexânicas (FHEX FLOR e FHEX FOL), diclorometano (FDCM FLOR e FDCM FOL) e acetato de etila (FAE FLOR e FDCM FOL), obtidos, respectivamente, das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia*, foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (KUJALA *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2005; MEDA *et al.*, 2005).

A 0,5 mL de cada amostra (EE, FHEX, FDCM e FAE), nas concentrações de 0,025 a 0,125 mg/mL, foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2N. Após um período de 2 minutos, foi acrescentado aos tubos 0,5 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 10% e 1,0 mL de água destilada e a mistura homogeneizada. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 760 nm, usando água destilada como branco. Ácido gálico (0,0025 a 0,00125 mg/mL), dissolvido em água, foi usado para elaboração da curva

de concentração padrão e os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg % de ácido gálico).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Neste trabalho foram utilizadas bioautografia, difusão em disco e macrodiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) para os extratos etanólicos, as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e as substâncias isoladas e identificadas, obtidas das flores e das folhas da *A. podalyriifolia*.

##### 4.5.1 Bioautografia

Para o ensaio de bioautografia, metodologia adaptada de CUNICO e colaboradores (2007), a amostra é aplicada em placas de CCD, desenvolvida com a fase móvel definida e sobre esta adicionado o meio de cultura com os microorganismos a serem avaliados. A presença de zonas de inibição do crescimento microbiano nos bioautogramas analisados indica a presença de compostos ativos, referenciados por seus Rfs.

As cepas gram positivas utilizadas nestes ensaios foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12229) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). Como cepas gram negativas foram utilizadas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) adquiridas da Newprov® em discos esterilizados e reconstituídas conforme recomendações do fabricante.

Na reconstituição destas cepas foi utilizado um disco liofilizado de cada microorganismo, que foi colocado em meio TSB e incubado em estufa a 35°C por uma noite (aproximadamente 15 horas). No dia seguinte, verificado o desenvolvimento microbiano uniforme, houve o repique em meio ágar Müller-Hinton, com auxílio de

alça estéril e, então, incubado a 35°C por 24 horas, para que na realização dos ensaios os microorganismos estivessem na fase logarítmica de crescimento.

Para o preparo dos inóculos foram retiradas colônias isoladas de cada um dos microorganismos, com auxílio de alça e em câmara de fluxo laminar e suspendidas com 10 mL de solução salina estéril 0,9%, em tubos de ensaio. Segundo recomendações do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1997), as suspensões bacterianas foram ajustadas em conformidade com o tubo 0,5 da escala Mac Farland, preparado pela adição de 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1%, correspondendo a  $10^8$  UFC/mL (BIER, 1990).

Em câmara de fluxo laminar, foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra (12, 5  $\mu$ g/ $\mu$ L) em placa de silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck (2,5 X 5,0 cm), utilizando fase móvel específica para cada amostra. Para o extrato etanólico, as frações diclorometano e acetato de etila e para a substância isolada da fração FAER 20, a fase móvel utilizada foi acetato de etila: ácido fórmico: água 90:5:5. Foi também utilizada a fase móvel clorofórmio: metanol 90:10 para a fração diclorometano, para a substância isolada FAER 4 ou a FDCMS 2 e para a fração hexânica. Para a substância RES foi empregada a fase móvel hexano:acetato de etila (150:7). As placas de CCD foram deixadas em estufa a 70°C por 20 min para a evaporação total dos solventes. Sob fluxo laminar, cada placa de CCD assim obtida foi colocada no centro de uma Placa de Petri estéril e fechada.

Em meio ágar Müeller-Hinton, anteriormente autoclavado e após ser resfriado até aproximadamente 35 °C, foi acrescentado o inóculo bacteriano padronizado conforme descrito anteriormente, sendo adicionado 1 mL do inóculo para cada 100 mL do meio e acrescentado 20 mL destes às respectivas placas de Petri contendo as placas de CCD com as amostras.

Como controles positivos de inibição do crescimento bacteriano, foram utilizados discos de cefalotina e cloranfenicol 0,030 mg e como controle negativo foram empregadas as placas de CCD sem as amostras, realizadas somente com a fase móvel correspondente e após a evaporação desta. Foi também realizado controle da esterilidade do meio e das placas, empregando somente as placas de CCD e o meio Ágar Mueller Hinton sem o inóculo.

Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada amostra. O material assim obtido, denominado de bioautograma, foi incubado por 24 hs a 35 °C. Após este período, em câmara de fluxo laminar, foi nebulizado com solução aquosa de trifeniltetrazolim a 1%, utilizado como revelador, e deixado por mais 30 minutos em estufa para se verificar as zonas de inibição.

#### 4.5.2 Difusão em disco

Pela metodologia da difusão em disco, adaptada de KONEMAN e colaboradores (1992), é verificada a presença de zonas de inibição do crescimento de cepas bacterianas gram positivas e gram negativas, em meio ágar Müeller-Hinton, perante os discos de papel impregnados com as amostras.

As mesmas amostras das flores e das folhas citadas anteriormente foram diluídas adequadamente com metanol, esterilizadas utilizando membranas filtrantes (Millex ®), com poro de 0,22 µm e adicionadas aos discos de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro, obtendo as concentrações de 1 e 0,5 mg/disco quando adicionados de 20 µL de cada uma destas amostras.

A partir dos inóculos padronizados citados anteriormente, em câmara de fluxo laminar, um Swab estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana. O excesso de líquido foi retirado ao se pressionar o Swab contra as paredes internas do tubo de ensaio e, em seguida, este foi esfregado em várias direções na placa de Petri com o meio ágar Müeller-Hinton, até a cobertura de toda a placa. Este procedimento foi realizado para cada uma das suspensões bacterianas.

Nas placas assim semeadas com as cepas bacterianas foram adicionados os discos de papel de filtro, previamente adicionados das amostras.



Foram ainda utilizados discos contendo cloranfenicol 0,030 mg como controle positivo e como controle negativo foram empregados discos impregnados com metanol e clorofórmio (solventes utilizados no preparo das amostras).

Os testes foram realizados em triplicata para cada um dos microorganismos e as placas incubadas a 35°C durante 24 horas. Após este período, as placas foram verificadas e os resultados registrados.

#### 4.5.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

As mesmas amostras e inóculos descritas anteriormente também foram submetidas à avaliação do potencial antibacteriano pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM ou MIC), através de macrodiluição em caldo, adaptada KONEMAN *et al.* (1992).

Alíquotas de 0,1 mL das suspensões bacterianas padronizadas foram misturadas com 100 mL de solução aquosa estéril de Tween 80 (2%) para então serem utilizadas nos testes. Diluições seqüenciais das amostras foram utilizadas (2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,065 mg/mL) e adicionadas aos tubos de ensaio contendo 1 mL de Caldo Tríplico de Soja estéril (TSB, Tryptic Soybean Broth). Sobre estes, foi adicionado 1 mL das cepas bacterianas preparadas conforme descrito anteriormente. Tubos controle negativo continham somente os microorganismos sem as amostras, enquanto que os controles positivos continham os microorganismos e cloranfenicol 2 mg/mL. Todo o processo foi realizado em duplicata. O material assim preparado foi incubado a 35°C por 24 horas.

A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração da amostra em que não ocorre o crescimento microbiano, verificado pela ausência de turvação no tubo com as amostras e os microorganismos (KONEMAN *et al.*, 1992).

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados no TECPAR e no laboratório de Controle de Qualidade II do Departamento de Farmácia da UFPR.

## 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A triagem antioxidante foi realizada nestes estudos através da determinação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio, pela atividade captadora ou seqüestrante do radical livre DPPH e pela captação de radicais peroxila no teste TBARS.

### 4.6.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio (adaptado de PRIETO *et al.*, 1999 e BIANCO, 2003)

Os extratos etanólicos (EE FLOR e EE FOL), as frações hexânicas (FHEX FLOR e FHEX FOL), diclorometano (FDCM FLOR e FDCM FOL) e acetato de etila (FAE FLOR e FAE FOL), as substâncias isoladas, obtidas das flores e das folhas, e os padrões de ácido ascórbico e rutina foram submetidos aos ensaios para detecção de atividade antioxidante através da verificação da formação do complexo fosfomolibdênio. Os extratos e frações obtidos das folhas também foram submetidos a estas avaliações.

A solução reagente do complexo fosfomolibdênio foi formada pela reação da solução de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (28 mL, 0,1 mol/L), com a solução de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (12 mL, 0,03 mol/L) e a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20 mL, 3 mol/L), em meio aquoso, com volume final ajustado para 100 mL com água destilada. A 1 mL desta solução reagente foram adicionados 0,3 mL das amostras avaliadas, com concentração 0,2 mg/mL, 1 mL de água destilada e a mistura incubada por 90 minutos a 95° C. O mesmo procedimento foi realizado para os padrões (ácido ascórbico e rutina 0,2 mg/mL). Após o resfriamento, procedeu-se à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 695 nm, usando a solução reagente como branco.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação ao padrão de ácido ascórbico, cuja atividade de referência foi considerada 100%.

#### 4.6.2 Ensaio com o radical livre DPPH

Na verificação da atividade antioxidante utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH<sup>•</sup>), inicialmente foi realizada uma avaliação qualitativa através de cromatografia em camada delgada nebulizada com solução de DPPH 0,2% (p/v) e, em seguida os ensaios quantitativos (espectroscópicos).

##### 4.6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada:

A metodologia empregada foi adaptada de CONFORTI e colaboradores (2002), utilizando placas de cromatografia em camada delgada (cromatofolha silicagel 60 F 254 Merck), nas quais foram aplicados 10 µL de cada amostra (10 mg/mL) e de rutina (1 mg/mL), utilizada como padrão, empregando acetato de etila : ácido fórmico : água (90: 5 : 5) como fase móvel. Em seguida, após a evaporação da fase móvel, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH, em metanol, e depois de 30 minutos, foram avaliadas e fotografadas.

##### 4.6.2.2 Avaliação da redução do radical DPPH por espectroscopia de UV-vis:

A ação antioxidante da *Acacia podalyriifolia* foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras captarem o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), conforme as metodologias descritas por GYAMFI, YONAMINE, ANIYA (1999), MEDA e colaboradores (2005) e WU e colaboradores (2005), com algumas modificações.

Para a avaliação desta atividade, alíquotas das amostras e padrões foram diluídas com etanol para se obter as concentrações de 0,5 a 400 µg/mL. A 3 mL de cada amostra foi acrescentado 0,1 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 1 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm, contra um branco específico em cada avaliação, formado somente pelas amostras nas suas respectivas diluições. Como controle, foi utilizado 0,1 mL de solução etanólica de DPPH 1 mM e 3 mL de etanol.

A atividade captadora (removedora) de radical foi obtida pela porcentagem de atividade antioxidante, conforme a equação:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

Sendo,

$Abs_{\text{amostra}}$ : absorbância da amostra

$Abs_{\text{controle}}$ : absorbância do controle

A determinação da  $EC_{50}$  (concentração efetiva), ou seja, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da acumulação de produtos oxidados por captar 50% dos radicais livres presentes na amostra, verificada pela diminuição da absorbância inicial apresentada na solução com a adição do radical livre DPPH, foi estimada pela equação obtida por regressão linear. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

#### 4.6.3 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS):

As mesmas amostras obtidas das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* foram submetidas ao teste TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico), segundo metodologia adaptada de MORAIS e colaboradores (2006), utilizando as

concentrações de 100, 500 e 1000 ppm (partes por milhão). Ácido ascórbico e BHT (butil hidróxi tolueno) foram empregados como padrões. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de cada amostra ou padrão e o volume completado para 1 mL com água destilada. Em seguida, foram adicionados a cada um dos tubos de ensaio 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidroclorato - AAPH (0,07 mol/L), 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico - TBA (0,8% p/v) em solução de dodecil sulfato de sódio - SDS (1,1% p/v). O material assim preparado foi submetido ao banho-maria (95<sup>o</sup> C) por 1 hora, sob agitação. Após resfriamento, foram adicionados a cada tubo 5 mL de n-butanol, centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes mensurados em espectrofotômetro em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com tubos controle, nos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a Equação:

$$IA (\%) = 1 - (Abs_{amostra}/Abs_{controle}) \times 100$$

Sendo,

Abs<sub>amostra</sub>: absorbância da amostra

Abs<sub>controle</sub> : absorbância do controle totalmente oxidado

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), avaliando-se as diferenças entre as concentrações e entre as amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

Os testes para avaliação de atividade antioxidante, utilizando as metodologias descritas com o radical livre DPPH, com o complexo fosfomolibdênio e com o teste TBARS foram realizados no laboratório de Fitoquímica e na Central Analítica do Departamento de Farmácia da UFPR.

#### 4.7 ENSAIO DE TOXICIDADE GERAL PELA *Artemia salina*

Este ensaio consiste da exposição das larvas (náuplios) de *Artemia salina* Leach aos extratos e substâncias obtidos das plantas (previamente evaporados e acrescidos de água salgada), sendo determinada a mortalidade destas larvas após 24 horas. Esta metodologia foi escolhida por ser prática, rápida, sensível e de baixo custo (MEYER *et al.* 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000).

A avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizada segundo metodologia padrão adaptada de MEYER *et al.* (1982), CAVALCANTE *et al.* (2000) e SANTOS *et al.* (2009). Tubos de ensaio contendo as amostras obtidas das flores e das folhas da *A. podalyriifolia* nas concentrações de 1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL foram deixados por 24 horas em estufa a 50°C para a evaporação total dos solventes. Ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados para eclodir em água salgada (composta por 41 g de sal marinho em 1000 mL de água purificada) por 48 horas, sobre agitação contínua, com temperatura controlada entre 27 e 30 °C e o pH ajustado entre 8 a 9 com carbonato de sódio. Após a eclosão dos ovos, foram transferidos 10 náuplios de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controle. Como controle positivo, foi utilizado dicromato de potássio nas mesmas concentrações das amostras, também previamente evaporado em estufa. Como controles negativos, foram utilizados somente tubos com a água salgada e também tubos com os solventes utilizados na diluição das amostras (metanol e hexano). O volume dos tubos foi ajustado com água salgada para 3 mL. Após 24 horas, foi verificado se havia mortalidade destes náuplios frente às amostras e controles e determinada a dose letal média que promovia 50% de mortes (DL<sub>50</sub>), estimada a partir de equações obtidas por regressão linear. Foram consideradas

ativas as amostras com  $DL_{50}$  menor que 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Todos os testes foram realizados em triplicata, contendo 10 náuplios cada um destes. Os dados de  $DL_{50}$  obtidos foram apresentados como valores das médias e desvio padrão.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Para avaliação da atividade alelopática foram utilizadas as mesmas amostras obtidas das flores e das folhas de *A. podalyriifolia*, bem como água e os demais solventes empregados no teste como controle.

A metodologia utilizada foi de verificação de ocorrência de efeitos inibitórios ou estimulantes na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* (alface), frente às amostras, adaptada de MALHEIROS e PERES (2001).

As sementes utilizadas na avaliação da germinação e do crescimento foram de *Lactuca sativa*, classe fiscalizada, cultivar Babá. Esta espécie foi escolhida como amostra nos biotestes por ser amplamente citada na literatura e apresentar características apropriadas: maior sensibilidade aos efeitos alelopáticos das plantas, ser facilmente encontrada, requerer pequeno período para a germinação e para o crescimento, não precisar de foto-período, possuir umidade e temperatura de germinação e crescimento bem definidas, a radícula da plântula apresentar um eixo único o que facilita a leitura do crescimento, além do tamanho da semente ser considerado mais uniforme (CARBALLEIRA; REIGOSA, 1999; FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

As amostras derivadas dos extratos e frações foram diluídas de forma a obter soluções com 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08  $\text{mg/mL}$  em metanol, exceto para o composto RES e para a fração hexânica (FHEX) que foram dissolvidos em hexano. As amostras foram preparadas em duplicata para as avaliações de germinação e de crescimento das sementes de *Lactuca sativa*.

Dentro das caixas Gerbox foram colocadas folhas de papel Whatman número 6, embebidas previamente com 5 mL de cada amostra, de forma que os papéis de filtro dentro das caixas Gerbox contivessem as concentrações descritas anteriormente.

Estas caixas Gerbox foram deixadas em estufa a 40°C por 24 horas para a evaporação total dos solventes e, após este período, foram adicionados 5 mL de água destilada e distribuídas 20 sementes de *L. sativa* em cada uma, em 4 repetições consecutivas de 5 sementes. Este material foi utilizado nos testes de germinação e de crescimento. Foram também realizados ensaios controle, submetidos às mesmas condições de ambiente, utilizando-se apenas os solventes (um destes com água, outro com metanol e outro com hexano) e as sementes (Figura 10).



FONTE: ANDRADE (2008)

FIGURA 10 - BRANCO (ÁGUA) PREPARADO PARA OS TESTES DE ALELOPATIA



#### 4.8.1 Teste da germinação

Neste teste foi avaliado o efeito de cada amostra sobre a germinação das sementes.

O material preparado e os controles foram colocados em germinador com limites de temperatura entre 20,5 e 23°C.

Na verificação da germinação, as sementes foram contabilizadas e retiradas aquelas que germinaram. Este procedimento foi realizado diariamente, sempre no mesmo horário, durante 6 dias, dentro de câmara de fluxo laminar para impedir contaminação com microorganismos.

#### 4.8.2 Teste do crescimento

Neste teste foram avaliados os efeitos de cada amostra sobre o crescimento da radícula e do caulículo (hipocótilo) da plântula.

Os materiais foram processados de modo similar ao do teste da germinação, sendo que somente após o 6º dia de incubação é que as amostras foram analisadas e os resultados relacionados estatisticamente aos obtidos para os controles. Foram avaliados os comprimentos da radícula (que origina a raiz) e o do hipocótilo (que origina o caule), utilizando papel milimetrado.

Os resultados obtidos foram relacionados estatisticamente com aqueles apresentados pelos controles.

A avaliação da atividade alelopática foi realizada no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da UFPR.

## 5 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEOR DE SÓLIDOS NO EXTRATO ETANÓLICO E NAS FRAÇÕES

Do particionamento do extrato etanólico (EE) resultaram as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e o resíduo que precipitou na obtenção do extrato etanólico.

Em aspectos gerais, o extrato etanólico, resíduo e suas frações, obtidos das flores, apresentaram um maior rendimento (42,60% p/p em relação às flores secas) do que quando obtido das folhas (27,02% p/p em relação às folhas secas). Para as flores, o maior rendimento entre as frações foi da fração acetato de etila (4,21%), enquanto que para as folhas foi a hexânica (5,97%) que até superou o resíduo (5,42%), conforme pode ser verificado na Tabela 2.

TABELA 2 – TEOR DE SÓLIDOS NA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES E DAS FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON

Extrato/ fração	Peso (g) a partir de 150 g de flores secas	Rendimento (% p/p) (flores secas)	Peso(g) a partir de 150 g de folhas secas	Rendimento (% p/p) (folhas secas)
EE	37,86	25,24	18,02	12,01
RES	15,35	10,23	8,13	5,42
FHEX	3,68	2,45	8,93	5,97
FDCM	0,7	0,47	0,91	0,61
FAE	6,31	4,21	4,53	3,01
<b>TOTAL</b>	<b>63,90</b>	<b>42,60</b>	<b>40,52</b>	<b>27,02</b>

Legenda: EE: extrato etanólico; RES (resíduo precipitado na obtenção do extrato etanólico); FHEX: fração hexânica; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila.

## 5.2 PESQUISA DE GRUPAMENTOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES

A triagem fitoquímica mostrou diferenças quando os extratos ou frações eram originários das flores ou das folhas. Para as flores, foram detectados flavonoides, taninos, compostos fenólicos e esteroides/triterpenoides, enquanto que no material obtido das folhas foi verificada a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, quinonas e esteroides/triterpenoides, conforme pode ser verificado na Tabela 3.

TABELA 3- RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO E DAS SUAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS FLORES E FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia* A. CUNN. EX G. DON

GRUPO FITOQUÍMICO	EE FLOR	EE FOL	FHEX FLOR	FHEX FOL	FDCM FLOR	FDCM FOL	FAE FLOR	FAE FOL
Alcaloides	N	P	N	N	N	P	N	N
Compostos fenólicos	P	P	P	P	P	P	P	P
Flavonoides	P	P	P	P	P	P	P	P
Cumarinas	N	N	N	N	N	P	N	N
Quinonas	N	N	N	N	N	N	N	P
Esteroides/ Triterpenoides	N	P	P	P	N	N	N	P
Saponinas	P*	P*	N	N	N	N	N	N
Taninos	P*	P*	N	N	N	N	N	N

Legenda: EE: extrato etanólico; FHEX: fração hexânica; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; FLOR: extrato ou frações obtidos das flores; FOL: extrato ou frações obtidos das folhas; P: resultado positivo para o grupo fitoquímico avaliado; N: resultado negativo para o grupo fitoquímico avaliado; P\*: resultado positivo detectado somente nos extratos aquosos.

A presença de diversas substâncias, pertencentes aos grupos detectados nesta triagem fitoquímica, pode estar relacionada às diferenças verificadas para os extratos e frações originários das flores e das folhas na avaliação dos testes biológicos.

### 5.3 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

O isolamento de substâncias foi realizado nos resíduos dos extratos etanólicos e nas frações hexânicas, diclorometano e acetato de etila, obtidas das flores e das folhas da *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, após a evaporação dos solventes, sob pressão reduzida e temperatura de 40° C.

#### 5.3.1 Fração acetato de etila das flores:

A fração acetato de etila, após armazenamento em freezer, resultou em um sedimento (FAES) e na fração remanescente (FAER).

##### 5.3.1.1 Fração remanescente

A fração acetato de etila remanescente, submetida à cromatografia em coluna (5g), demonstrou cristalização nas frações 4 a 8 (denominado FAER 4, 7 mg, cristal amarelo em agulhas) e 20 a 33 (denominado de FAER 20, 482 mg, cristal branco em agulhas).

##### 5.3.1.1.1 Substância FAER 4

Para o composto FAER 4 (7 mg), a análise por espectrometria no IV (Figura 11), utilizando equipamento BIO-RAD, demonstrou bandas de forte intensidade entre 3280 e 3053  $\text{cm}^{-1}$ , característica da presença de hidroxilas fenólicas (deformação axial), em 1639  $\text{cm}^{-1}$  relativa à presença de carbonila conjugada e um conjunto de bandas próximas a 1602  $\text{cm}^{-1}$  característica de insaturações (C=C) do anel aromático. As bandas entre 1083 e 731  $\text{cm}^{-1}$  representam as deformações angulares de C-H do anel aromático (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

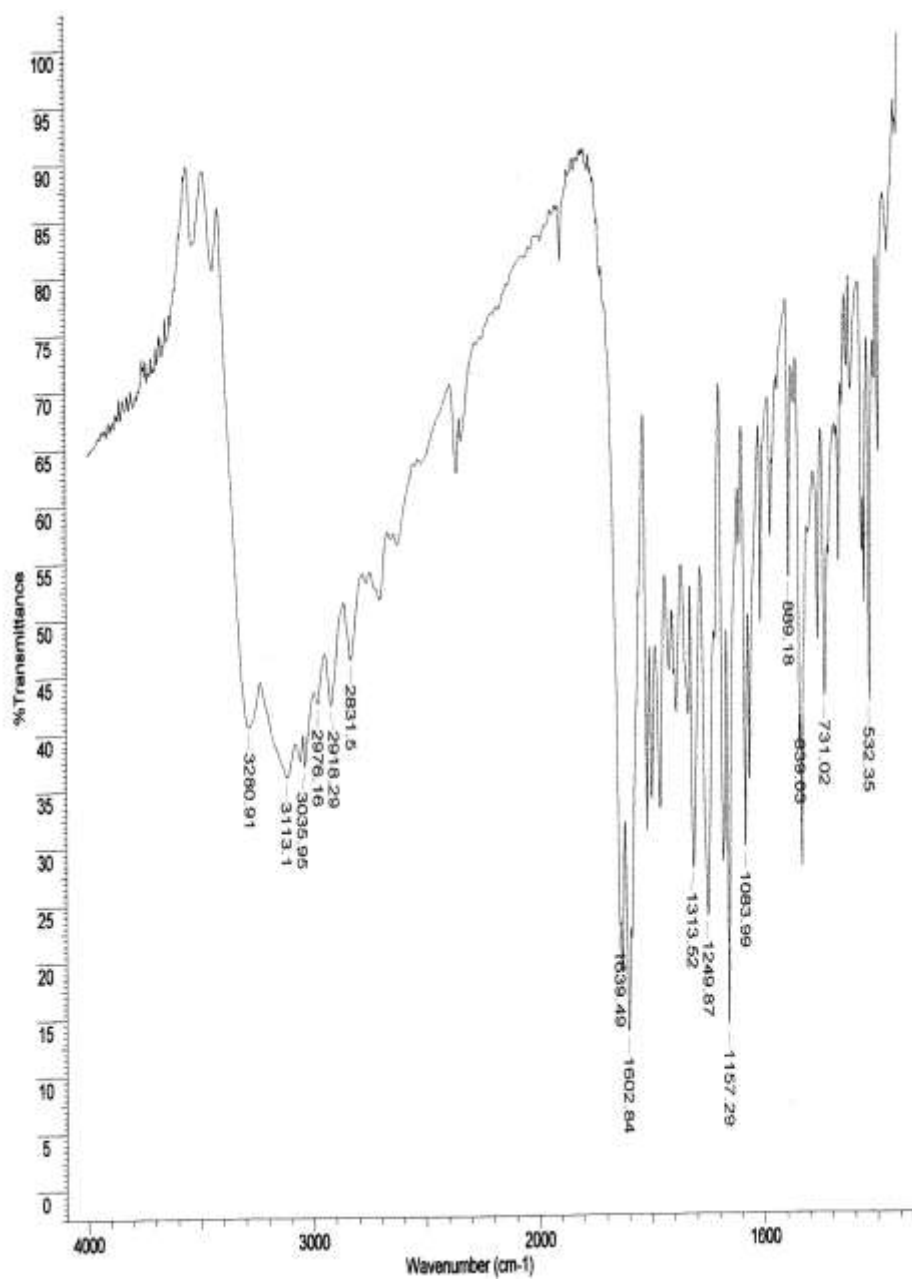


FIGURA 11 – ESPECTRO NO IV DA SUBSTÂNCIA FAER 4

Os resultados obtidos a partir da espectroscopia no UV, utilizando os reativos diagnósticos descritos em MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970), estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA DA FRAÇÃO FAER 4

Reagente	$\lambda$ nm (log $\epsilon$ )
MeOH	210 (4,26); 288 (4,06); 320 (3,65)
NaOMe	244 (4,00); 322 (4,18)
NaOAc	290 (3,95); 324 (4,05);
NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	288 (4,06); 320 (3,74)
AlCl <sub>3</sub>	309 (3,99); 370 (3,40)
AlCl <sub>3</sub> / HCl	310 (3,43); 374 (3,45)

A Figura 10 apresenta os espectros no UV com os reagentes diagnósticos para a substância FAER 4 (I: solução metanólica com adição de metóxido de sódio; II: adição de acetato de sódio à solução metanólica e após acrescentar o ácido bórico; III: adição de cloreto de alumínio à solução metanólica e com o acréscimo de ácido clorídrico).

A observação de um máximo de absorvância a 288 nm, com um ombro a 320 nm no espectro de UV da solução metanólica indicou a presença de flavonoide do tipo flavanona, segundo MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970). Os sinais de RMN de <sup>1</sup>H a  $\delta$  2,67 (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $2\alpha$ ;  $J = 12,6$  Hz,  $3\beta$ ; H<sub>3 $\alpha$</sub> ), 3,10 (1H, *dd*,  $J = 12,8$  Hz,  $2\alpha$ ;  $J = 17,2$  Hz,  $3\alpha$ ; H<sub>3 $\beta$</sub> ), 5,21 (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $3\alpha$ ;  $J = 12,8$  Hz,  $3\beta$ ; H<sub>2 $\alpha$</sub> ), ao detectar a presença dos hidrogênios  $3\alpha$  e  $3\beta$  confirma os dados de UV sobre a presença de uma flavanona. Estes dados estão associados aos do RMN de <sup>13</sup>C em 44,0 (referente ao C-3) e 80,5 ppm (C-2).

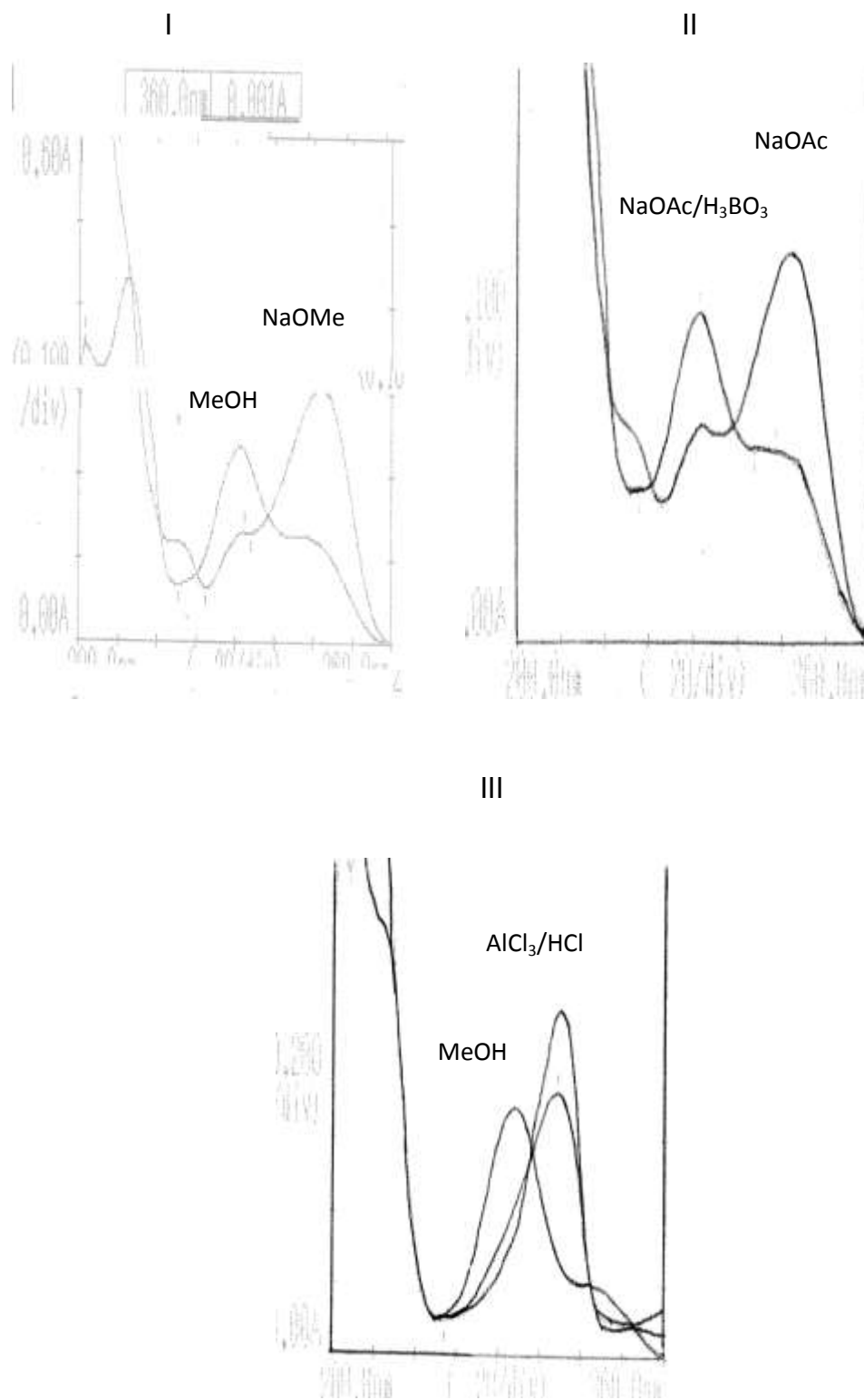


FIGURA 12 – ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA FAER 4

Pela análise no UV, o deslocamento batocrômico de 34 nm observado pela adição de metóxido de sódio (NaOMe) à solução metanólica indica a presença de hidroxila livre na posição 7. Isto se confirma pelo deslocamento batocrômico de 36 nm na banda II, provocado pela adição de acetato de sódio (NaOAc) à solução metanólica (KERBER, 1988; KERBER, SILVA, 1993; SILVA, 2001; PEITZ, 2003). Ao utilizar o NaOMe ou o NaOAc ocorre a ionização da hidroxilas fenólicas, sendo particularmente utilizado para identificar a presença de hidroxila livre na posição 7 quando ocorre um deslocamento batocrômico, respectivamente, nas bandas I ou II (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970). Com a adição de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) à solução contendo acetato de sódio foi verificado que o espectro retornou à posição original, caracterizando a ausência de grupamentos *orto*-di-hidróxi (KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993; SILVA, 2001; PEITZ, 2003). Isto ocorre porque o  $H_3BO_3$  quelata os grupos *orto*-di-hidróxi em todas as posições no flavonoide, exceto em C-5 e C-6, o que provocaria um deslocamento batocrômico em compostos com anel B contendo estes grupos em C-3' e C-4' (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970), o que não foi verificado com esta substância. A adição de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) à solução metanólica provocou um deslocamento do espectro de 21 nm e de 22 nm após adição de ácido clorídrico (HCl), indicando a presença de grupamentos hidroxila livre em C-5 (KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993; SILVA, 2001; PEITZ, 2003). Isto ocorre porque o  $AlCl_3$  forma complexos estáveis com compostos que têm grupos hidroxila em C-3 ou C-5 e mais lábeis com grupos *orto*-di-hidróxi. Ainda que o complexo formado com os grupos *orto*-di-hidróxi se decomponha rapidamente, a complexação com o grupamento cetona na posição 4 e o grupo hidroxila em C-5 é estável na presença de HCl. Assim, o deslocamento batocrômico, verificado em relação ao espectro original da solução metanólica, permite a confirmação da presença de hidroxila livre em C-5 (MABRY, MARKHAN, THOMAS, 1970). Os sinais de RMN de  $^1H$   $\delta$  5,88 ppm (2H, *d*,  $J = 1,0$  Hz, H6, 8) e RMN de  $^{13}C$  a 96,2 e 97,1 ppm, referentes aos prótons e carbonos em C-6 e C-8, respectivamente, associados com o singlete em 12,07 ppm, indicando hidroxila em C-5, confirmam os dados de UV que demonstravam presença de hidroxilas em C-5 e C-7, através do deslocamento após adição de acetato de sódio/ácido bórico e cloreto de alumínio/ácido clorídrico.



SILVERSTEIN e colaboradores (1991) afirmam que a constante de acoplamento  $J = 12,8$  Hz, verificada entre o  $H_{2\alpha}$  e o  $H_{3\beta}$ , corresponde um ângulo de diedro de  $180^\circ$  e ao  $J = 3,0$  Hz, observada entre o  $H_{2\alpha}$  e o  $H_{3\alpha}$ , corresponde um ângulo de diedro de  $55^\circ$ , de acordo com a correlação de Karplus. Estas correlações associadas ao uso de modelos moleculares permitem indicar que o anel aromático mono-substituído está em posição  $\beta$  em relação ao plano do núcleo  $\gamma$ -pirona.

Acoplamento em *meta* no anel A ( $H_6/H_8$ ), com as posições 5 e 7 substituídas, pôde ser verificado pelo dubleto em  $\delta$  5,88 (2H, *d*,  $J = 1,0$  Hz) e pelo RMN de  $^{13}C$  em 96,2 (C-6) e 97,1 ppm (C-8), em conformidade com os dados de UV que demonstravam hidroxilas livres em C5 e em C7, pelo deslocamento após a adição de cloreto de alumínio.

O sinal RMN de  $^1H$  a  $\delta$  7,30 (2H, *d*,  $J = 8,6$  Hz,  $H_{2'}$ ,  $6'$ ) associado ao RMN de  $^{13}C$  a 129,1 (C-2' e C-6') e RMN de  $^1H$  a 6,81 ppm (2H, *d*,  $J = 8,6$  Hz,  $H_{3'}$ ,  $5'$ ) com RMN de  $^{13}C$  116,4 (C-3' e C-5') indicaram um sistema *para* substituído no anel B.

Os dados de RMN de  $^1H$  e de RMN de  $^{13}C$  e os respectivos espectros estão demonstrados na Tabela 5 e nas Figuras 13 e 14.

TABELA 5 - DADOS DOS ESPECTROS DE RMN de  $^1H$  e RMN de  $^{13}C$  DA SUBSTÂNCIA DA FAER 4, EM METANOL DEUTERADO

Posição	RMN de $^1H$ ( $\delta$ ppm)	J (Hz) [H acoplado-nº]	Posição	RMN de $^{13}C$ ( $\delta$ ppm)
$2\alpha$	5,21 dd	3,0 [ $H_{3\alpha}$ ], 12,8 [ $H_{3\beta}$ ]	2	80,5
$3\alpha$	2,67 dd	3,0 [ $H_{2\alpha}$ ], 17,2 [ $H_{3\beta}$ ]	3	44,0
$3\beta$	3,10 dd	12,8 [ $H_{2\alpha}$ ], 17,2 [ $H_{3\alpha}$ ]	4	197,8
OH	12,07 s		5	165,5
6	5,88 d	1,0 [H8]	6	96,2
8	5,88 d	1,0 [H6]	7	168,4
			8	97,1
			9	164,9
			10	103,4
			1'	131,1
$2'$	7,30 d	8,6 [ $H_{3'}$ ]	$2'$	129,1
$3'$	6,81 d	8,6 [ $H_{2'}$ ]	$3'$	116,4
			$4'$	159,0
$5'$	6,81 d	8,6 [ $H_{6'}$ ]	$5'$	116,4
$6'$	7,30 d	8,6 [ $H_{5'}$ ]	$6'$	129,1

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 4 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]

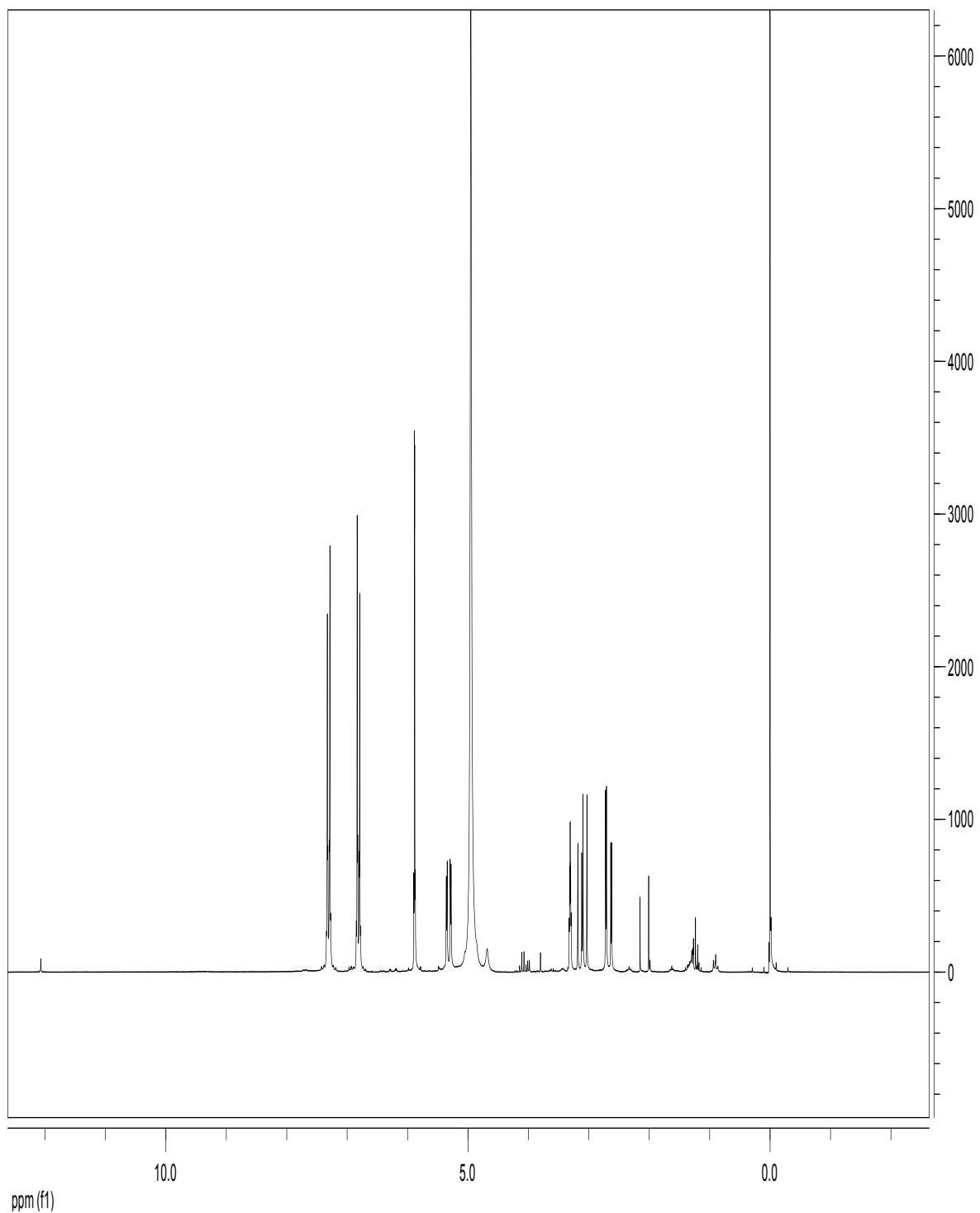


FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 4 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]

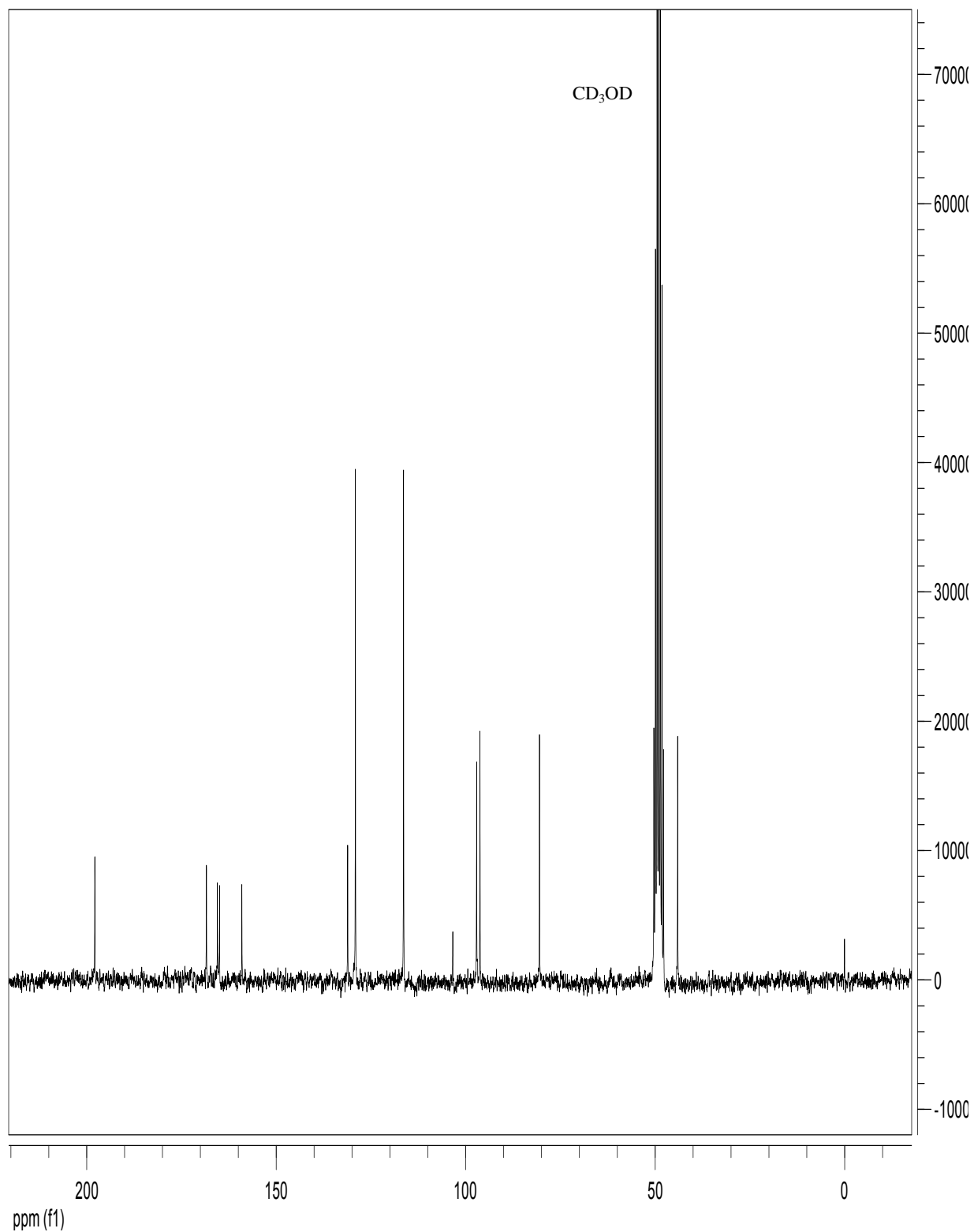
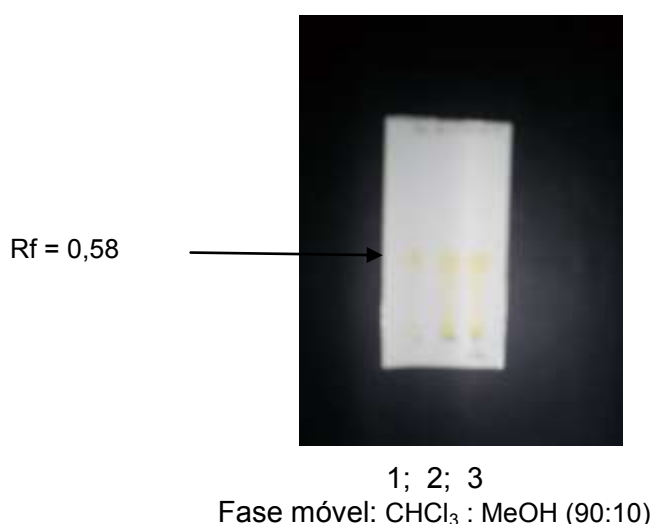


FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 4 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz]

Comparando-se os dados obtidos com os descritos em literatura para a mesma substância (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970; KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993 e SILVA, 2001 para o UV; KERBER, 1988; AGRAWAL, 1992; KERBER; SILVA, 1993; SAITO *et al.*, 1994; OGUNDAINI *et al.*, 1996; SILVA, 2001; ZAPESOCHNAYA *et al.*, 2002; MORIMURA *et al.*, 2006 para o RMN de  $^1\text{H}$  e para o RMN de  $^{13}\text{C}$  RMN), posterior CCD utilizando o padrão ( $R_f = 0,58$  em  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  90:10) e ponto de fusão de  $250\text{ }^\circ\text{C}$  (também relatado por KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993 e SILVA, 2001), propõe-se que a substância FAER 4 seja a naringenina (Figuras 15 e 16).

A presença desta substância ainda não havia sido relatada em *Acacia podalyriifolia*, mas já tinha sido obtida de *Acacia longifolia* (Andr.) Will por KERBER, 1988; KERBER *et al.*, 1993; SILVA, 2001 e PEITZ, 2003.



Legenda: substâncias 1 = FAER 4 2, 2 = Naringenina, 3 = FAER 4 + Naringenina,  $\text{CHCl}_3$  (clorofórmio), MeOH (metanol)

FIGURA 15- CCD COM AMOSTRA FAER 4, PADRÃO DE NARINGENINA E AMOSTRA + NARINGENINA

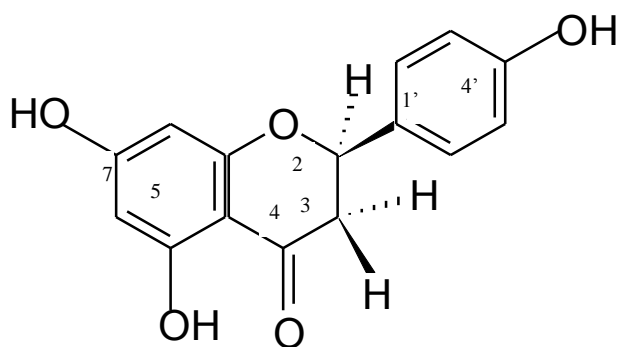


FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA NARINGENINA (5, 7, 4' TRI HIDRÓXI-FLAVANONA)

#### 5.3.1.1.2 Substância FAER 20

Para a substância FAER 20, pela espectroscopia no infravermelho (Figura 17), foi observada uma banda larga de forte intensidade em  $3361\text{ cm}^{-1}$  característica da presença de hidroxilas fenólicas (deformação axial). A banda de média intensidade em  $1685\text{ cm}^{-1}$  estaria relacionada à carbonila conjugada. As bandas de forte intensidade em  $1585$  e  $1616\text{ cm}^{-1}$  são características de insaturação (C=C) do anel aromático. As bandas entre  $1056$  e  $842\text{ cm}^{-1}$  representam as deformações angulares de C-H do anel aromático (SILVERSTEIN *et. al.*, 1991).

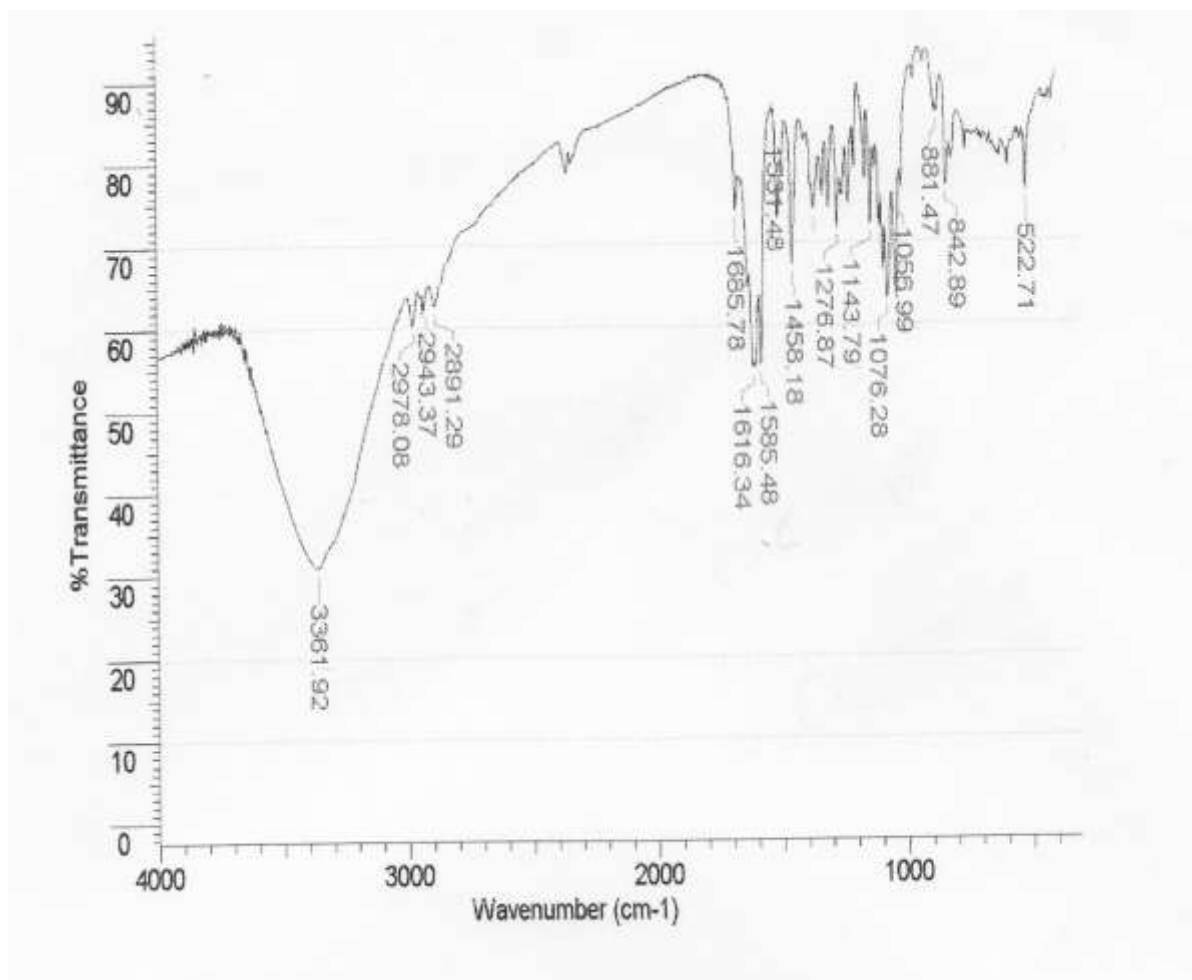


FIGURA 17 – ESPECTRO NO IV DA SUBSTÂNCIA FAER 20

A Tabela 6 descreve as absorvâncias máximas visualizadas para a solução metanólica da substância FAER 20 e para os reativos diagnósticos, segundo MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970).

TABELA 6 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA FAER 20

Reagente	$\lambda$ nm (log $\epsilon$ )
MeOH	225 (4,23 ), 283 (3,96), 317 (3,72)
NaOMe	253 (4,09), 321 (3,88)
NaOAc	256 (3,55), 321 (3,88)
NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	283 (3,99), 318 (3,65)
AlCl <sub>3</sub>	226 (4,28), 282 (4,07), 320 (3,64)
AlCl <sub>3</sub> / HCl	226 (4,28), 282 (4,07), 320 (3,54)

A Figura 18 apresenta os espectros no UV com os reagentes diagnósticos para a substância FAER 20 (I: solução metanólica com adição de metóxido de sódio; II: adição de acetato de sódio à solução metanólica e após acrescentar o ácido bórico; III: adição de cloreto de alumínio à solução metanólica e com o acréscimo de ácido clorídrico).

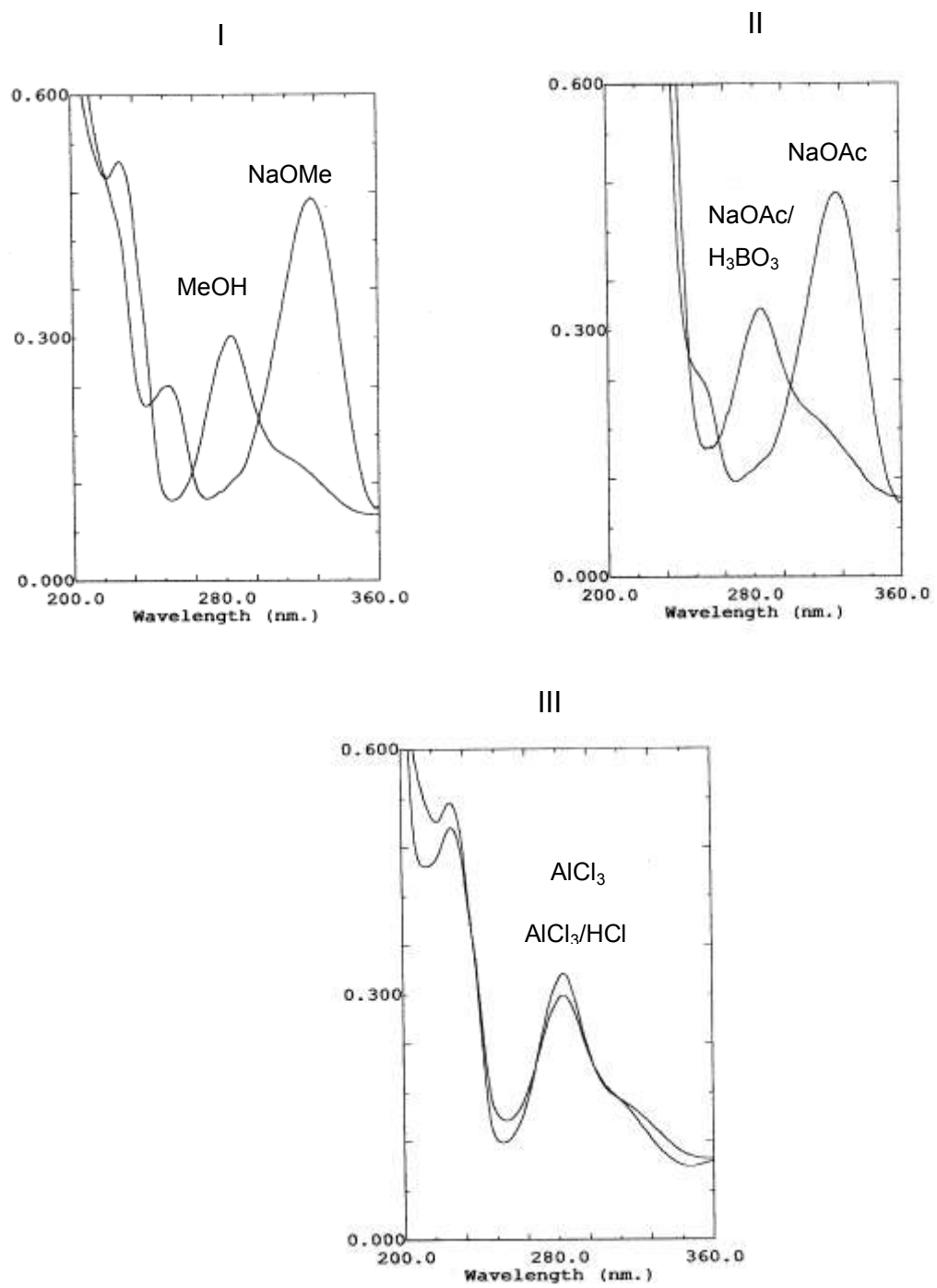


FIGURA 18 – ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA FAER 20



A observação de um máximo de absorvância a 283 nm, com um ombro a 320 nm no espectro no UV da solução metanólica indicou a presença de flavonoide do tipo flavanona, segundo MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970). Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  2,57 (1H, *dd*,  $J = 2,7$  Hz,  $2\alpha$ ; 17,1 Hz,  $3\beta$ ; H $3\alpha$ ), 3,04 (1H, *dd*,  $J = 13,2$  Hz,  $2\alpha$ ; 17,1 Hz,  $3\alpha$ ; H $3\beta$ ), 5,35 (1H, *dd*,  $J = 2,7$  Hz,  $3\alpha$ ; 13 Hz,  $3\beta$ ; H $2\alpha$ ), associados aos do RMN de  $^{13}\text{C}$  em 44,5 (C-3) e 78,1 ppm (C-2), ao detectar a presença dos hidrogênios  $3\alpha$  e  $3\beta$  confirma os dados no UV sobre a presença de uma flavonona.

O deslocamento batocrômico de 38 nm observado pela adição de metóxido de sódio (NaOMe) à solução metanólica indica a presença de hidroxila livre na posição 7. Isto se confirma pelo deslocamento batocrômico de 38 nm na banda II, provocado pela adição de acetato de sódio (NaOAc) à solução metanólica. Com a adição de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) à solução contendo acetato de sódio foi verificado que o espectro retornou à posição original, caracterizando a ausência de grupamentos *orto*-di-hidróxi e/ou hidroxilas livres no C5. A adição de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) à solução metanólica não provocou deslocamento do espectro, mesmo após adição de ácido clorídrico (HCl), confirmando a ausência de grupamentos *orto*-di-hidróxi ou hidroxila livre em C5 (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970; KERBER, 1988; KERBER *et al.*, 1993; SILVA, 2001).

De modo semelhante ao que já foi descrito anteriormente, pode-se afirmar que o anel aromático mono-substituído também está em posição  $\beta$  em relação ao plano do núcleo  $\gamma$ -pirona.

Acoplamento em *meta* no anel A (H6/H8), com as posições 5 e 7 substituídas, pôde ser verificado pelos sinais no  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  6,06 (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz, H8; H6) e  $^{13}\text{C}$  RMN 98,9 (C-6),  $^1\text{H}$  RMN em 6,38 (1 H, *d*,  $J = 2,1$  Hz, H6; H8) e  $^{13}\text{C}$  RMN em 97,8 ppm (C-8), em conformidade com os dados no UV que demonstravam hidroxila livre no C7 mas não no C5, pela ausência de deslocamento após a adição de cloreto de alumínio. O congestionamento de sinais no RMN na região entre  $\delta$  3,17 e 3,23 associado com a presença de 73,5 (C-2''), 77,57 (C-3''), 69,6 (C-4'') e 75,5 (C-5''), 3,71 (1H, *d*,  $J = 7,2$  Hz,  $6''\alpha$ ; H $6''\beta$ ) e 3,51 (1H, *dd*,  $J = 7,2$  Hz,  $6''\beta$ ; 12 Hz,  $5''$ ; H $6''\alpha$ ) com 60,70 (C-6''), 4,68 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz; H1'') com 103,48 ppm (C-1''), estavam relacionados à presença de glicosídeo, ligado ao C5 do anel A. A configuração em  $\alpha$  ou  $\beta$  é dada pela constante de

acoplamento do hidrogênio anomérico (H1''), identificado pelo duplete em  $\delta$  4,68, com constante de acoplamento de 7,5 Hz, indicando configuração  $\beta$  para este glicosídeo que foi identificado como sendo D-glicose.

A presença de *para* substituição no anel B foi demonstrada pelos sinais a  $\delta$  7,30 (2H, *d*,  $J = 8,4$  Hz; H2', 6') associado a 128,3 (C-2' e C-6') e 6,77 ppm (2H, *d*,  $J = 8,4$  Hz; H3', 5') com 115,1 (C-3' e C-5').

Os dados obtidos para a substância FAER 20 nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como os seus respectivos espectros estão demonstrados na Tabela 7 e nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

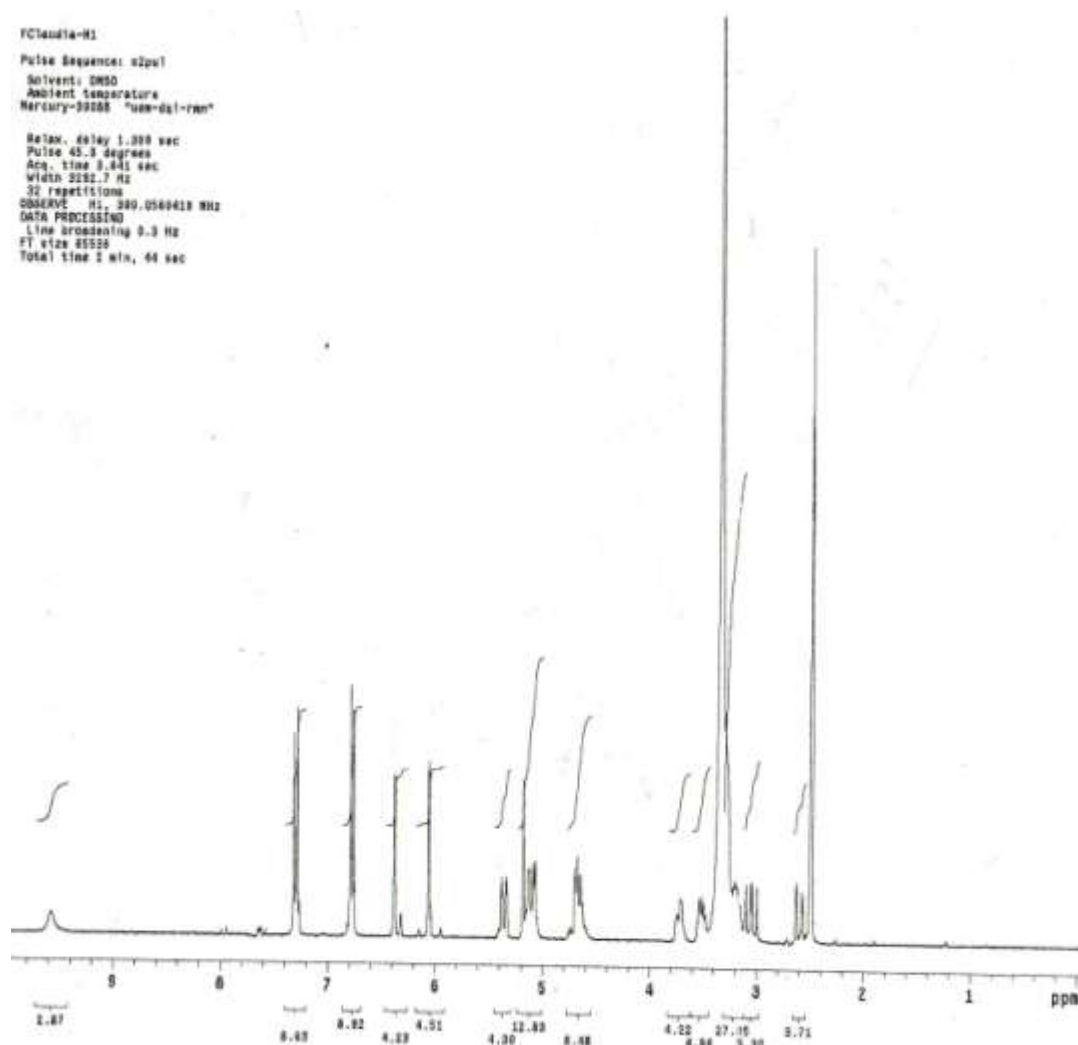


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 20 [DMSO, 300 MHz]

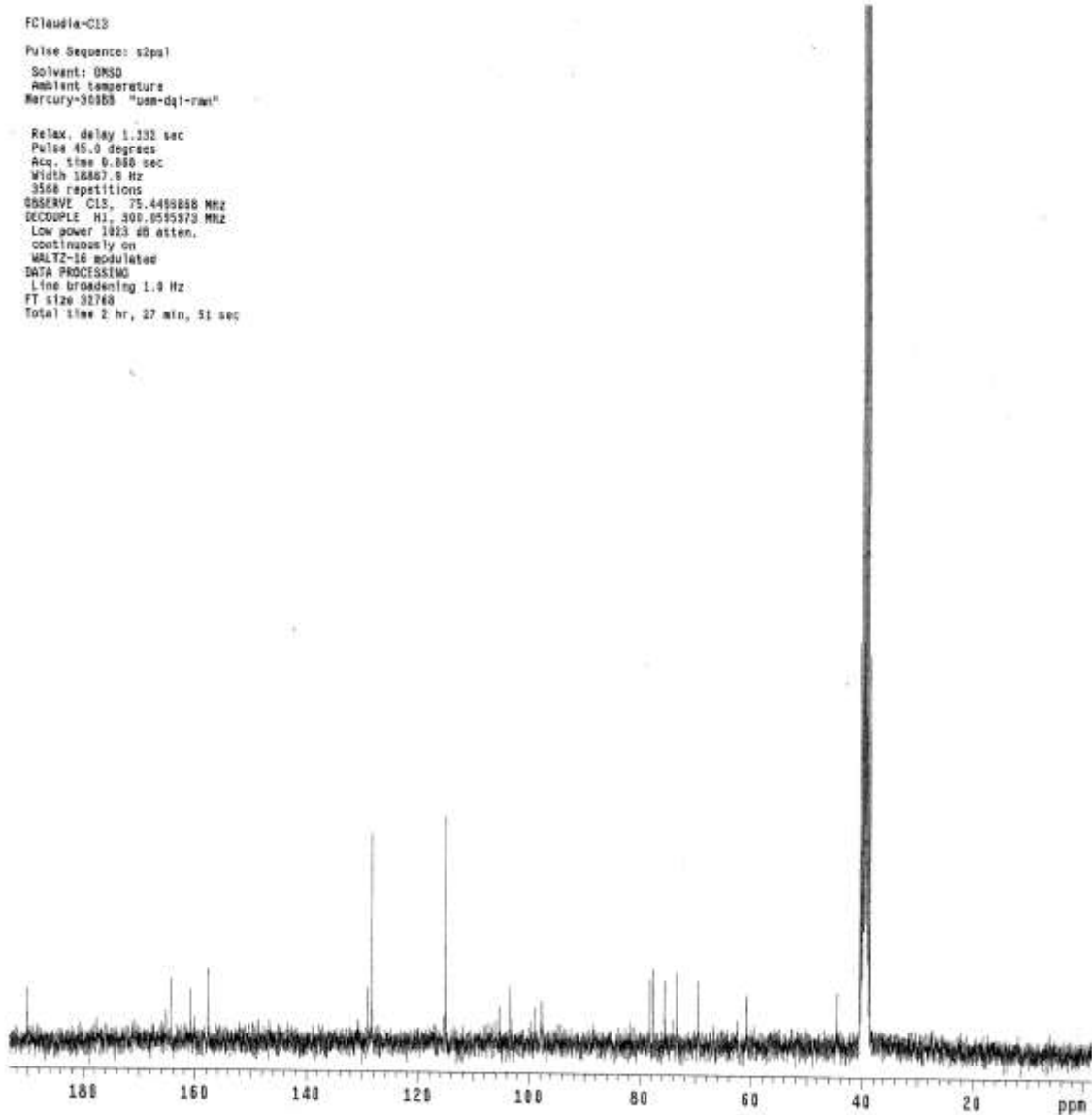


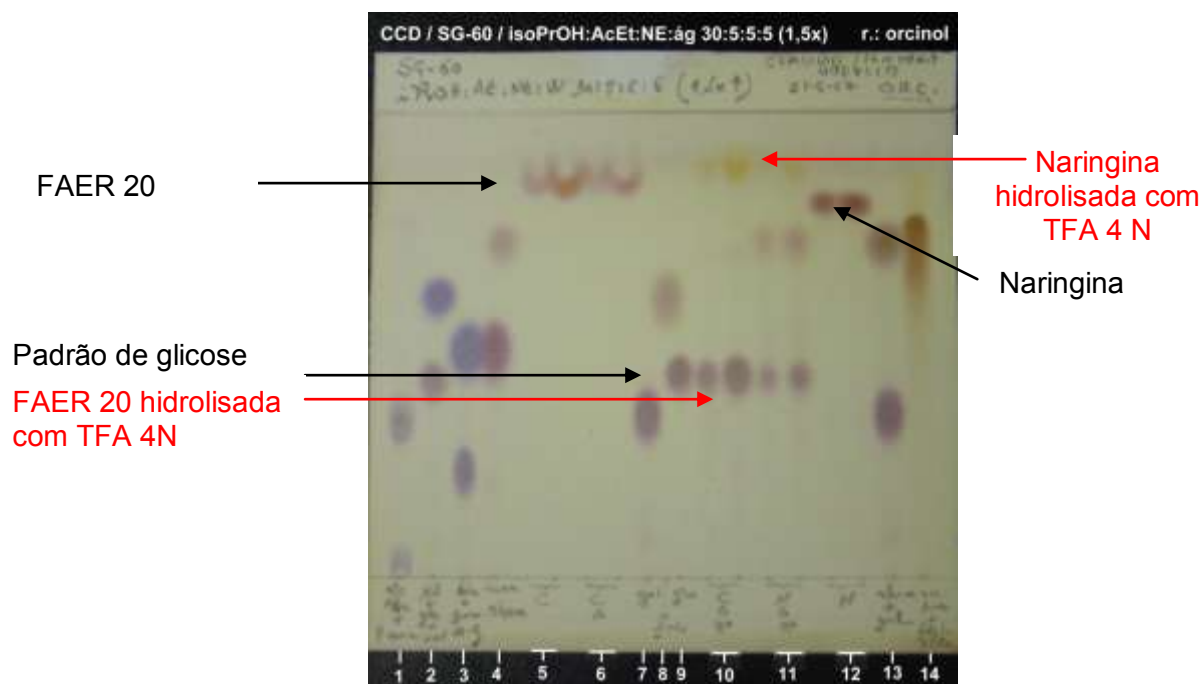
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 20 [DMSO, 75 MHz]

TABELA 7 – DADOS DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FAER 20 EM DMSO (300 e 75 MHz, RESPECTIVAMENTE).

Posição	RMN de $^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)	J (Hz) [H acoplado-nº]	Posição	RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)
2 $\alpha$	5,35 dd	2,7 [H3 $\alpha$ ], 13,2 [H3 $\beta$ ]	2	78,1
3 $\alpha$	2,59 dd	2,7[H2], 17,1 [H3 $\beta$ ]	3	44,5
3 $\beta$	3,04 dd	13,2 [H2], 17,1 [H3 $\alpha$ ]	4	190,1
			5	160,7
6	6,06 d	2,1 [H8]	6	98,9
			7	165,1
8	6,38 d	2,1 [H6]	8	97,8
			9	165,2
			10	105,4
			1'	128,9
2'	7,30 d	8,4 [H3']	2'	128,3
3'	6,77 d	8,4 [H2']	3'	115,1
			4'	157,7
5'	6,77 d	8,4 [H6']	5'	115,1
6'	7,30 d	8,4 [H5']	6'	128,3
1''	4,68 d	7,5	1''	103,5
2''	3,17 – 3,23 m		2''	73,5
3''	3,17 – 3,23 m		3''	77,6
4''	3,17 – 3,23 m		4''	69,6
5''	3,17 – 3,23 m		5''	75,6
6'' $\alpha$	3,51 dd	7,2 [H6'' $\beta$ ], 12,0 [H5'']	6''	60,7
6'' $\beta$	3,72 d	7,2 [H6'' $\alpha$ ]		

A Figura 21 demonstra a CCD realizada com a substância FAER 20 comparada aos respectivos padrões, denominados por números de 1 a 13. Os padrões foram denominados pelos números 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 (ácido glucurônico + beta-escina, xilose + glicose, arabinose + galactose, ramnose + manose, galactose, fucose, glucose, naringina hidrolisada com TFA, naringina, ramnose + galactose, rutina + frangulosídeo, respectivamente). As amostras de FAER 20 foram representadas pelos números 5, 6 e 10 (respectivamente, sem aquecimento em estufa, submetida à estufa sem TFA e submetida à estufa com TFA) para avaliar a hidrólise e se o aquecimento em estufa não estaria influenciando neste processo.

Foi utilizada como fase móvel isopropanol: acetato de etila: nitroetano: água (30:5:5:5) e orcinol 1% em metanol: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), com aquecimento, como revelador.



Legenda: Padrões: 1= ácido glucurônico + beta-escina, 2= xilose + glicose, 3=arabinose + galactose, 4= ramnose + manose, 7= galactose, 8= fucose, 9= glucose, 11=naringina hidrolisada com TFA, 12= naringina, 13 = rhamnose + galactose, 14= rutina + frangulosídeo.

Amostras: 5 = FAER 20 sem aquecimento em estufa, 6 = FAER 20 submetida à estufa por 2 hs, sem TFA, 10 = FAER 20 + TFA em estufa por 2 hs para a hidrólise. Fase móvel: isopropanol: acetato de etila: nitroetano: água (30:5:5:5). Revelador: orcinol 1% em metanol: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), com aquecimento.

FIGURA 21 – CCD COM A AMOSTRA FAER 20 SUBMETIDA À HIDRÓLISE COM TFA 4N E OS RESPECTIVOS PADRÕES.

Comparando-se os dados obtidos com os descritos em literatura (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970; KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993 e SILVA, 2001 para o UV; KERBER, 1988; AGRAWAL, 1992; KERBER; SILVA, 1993; SAITO *et al.*, 1994; OGUNDAINI *et al.*, 1996; SILVA, 2001; ZAPESOCHNAYA *et al.*, 2002; MORIMURA *et al.*, 2006 para o RMN de  $^1\text{H}$  e para o RMN de  $^{13}\text{C}$  RMN), ponto de fusão de 172-173 °C (também obtido por OGUNDAINI *et al.*, 1996) e o desvio da luz polarizada (utilizando polarímetro digital), propõe-se que esta substância refira-se a 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina (Figura 22). A sua presença não havia ainda sido mencionada em *Acacia podalyriifolia* A. Cunn, mas já fora relatado nas flores de *Acacia longifolia* (KERBER, 1988; KERBER; SILVA 1993 e SILVA, 2001).

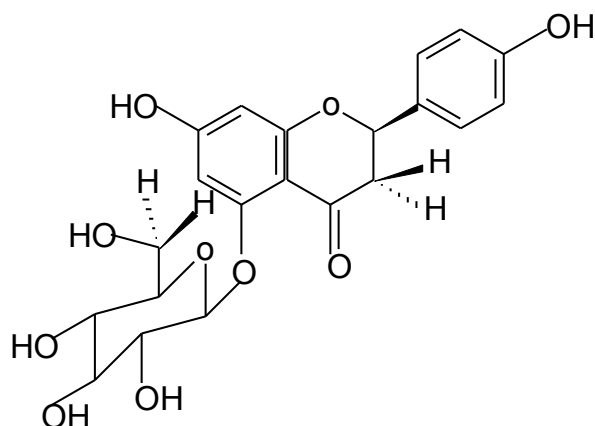


FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DE 5- $\beta$ -D-GLICOSIL-NARINGENINA

### 5.3.1.2 Fração acetato de etila sedimentada

Para o material da fração acetato de etila que sedimentou no freezer e que também foi submetido à cromatografia em coluna (208 mg), foi verificada cristalização nas frações 9 a 16 (denominado de FAES 9, correspondendo a 15 mg, cristal amarelo em agulhas, obtidos com os gradientes de acetato de etila:água:ácido fórmico 98:1:1 e 95:3:2).

Os dados obtidos para a substância FAES 9 nos espectros de UV, RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como os seus respectivos espectros estão demonstrados nas Tabelas 8 e 9 e nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

Os dados da espectroscopia no UV e de RMN, o ponto de fusão de 172-173 °C, o desvio da luz polarizada e a comparação de CCD da substância FAES 9, após hidrólise, com as amostras autênticas de açúcares e de naringenina, foram similares aos descritos anteriormente para a FAER 20, sugerindo tratar-se da mesma substância demonstrada na Figura 20, a 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina.

TABELA 8 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA DA FRAÇÃO FAES 9

Reagente	$\lambda$ nm (log $\epsilon$ )
MeOH	211 (4,62), 283 (4,18), 320 (3,95)
NaOMe	253 (4,09), 321 (3,88)
NaOAc	253 (3,95), 324 (4,31)
NaOAc / $\text{H}_3\text{BO}_3$	283 (4,24), 319 (4,09)
$\text{AlCl}_3$	282 (4,24), 320 (3,75)
$\text{AlCl}_3$ / HCl	283 (4,26), 320 (3,87)

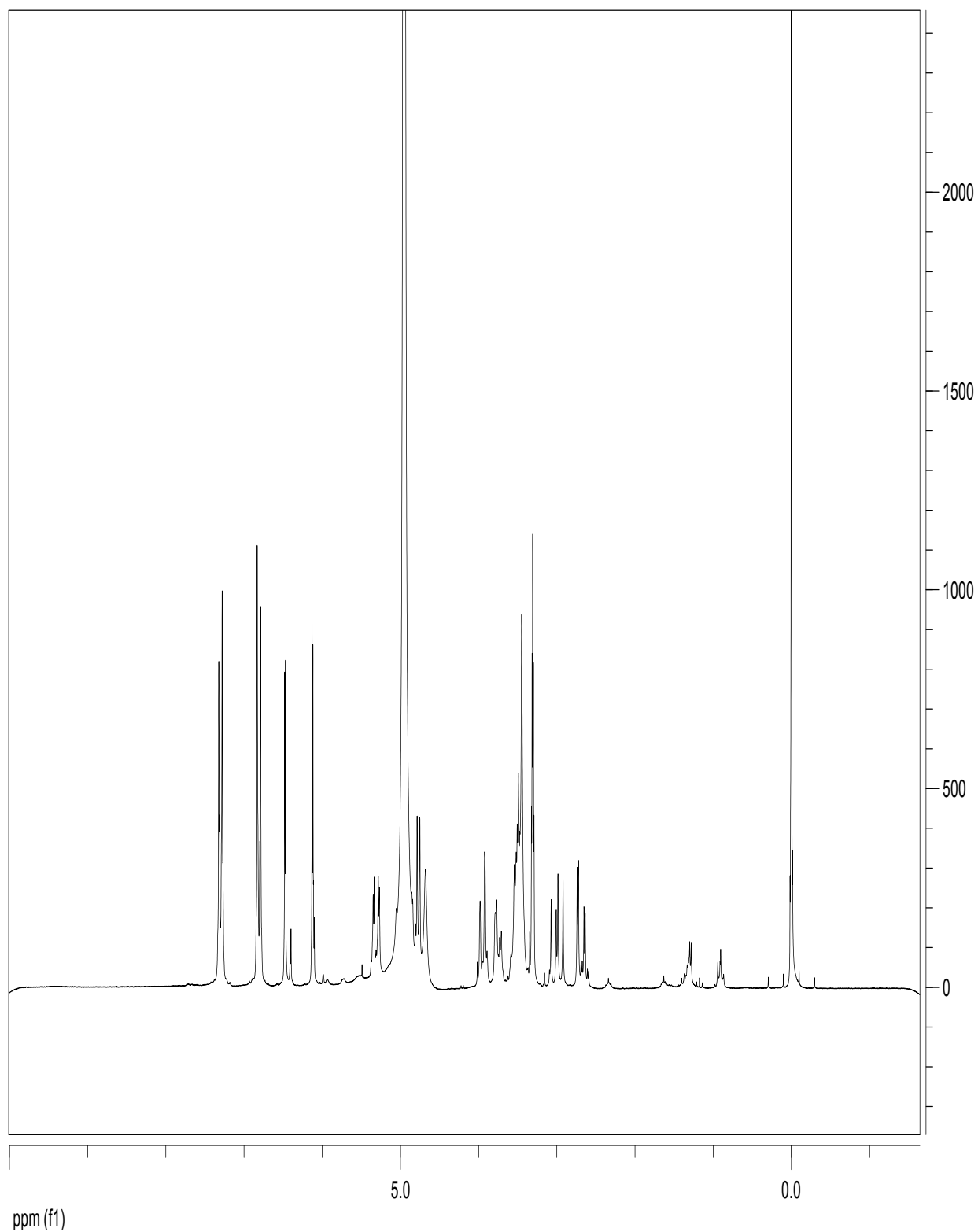


FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FAES 9 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



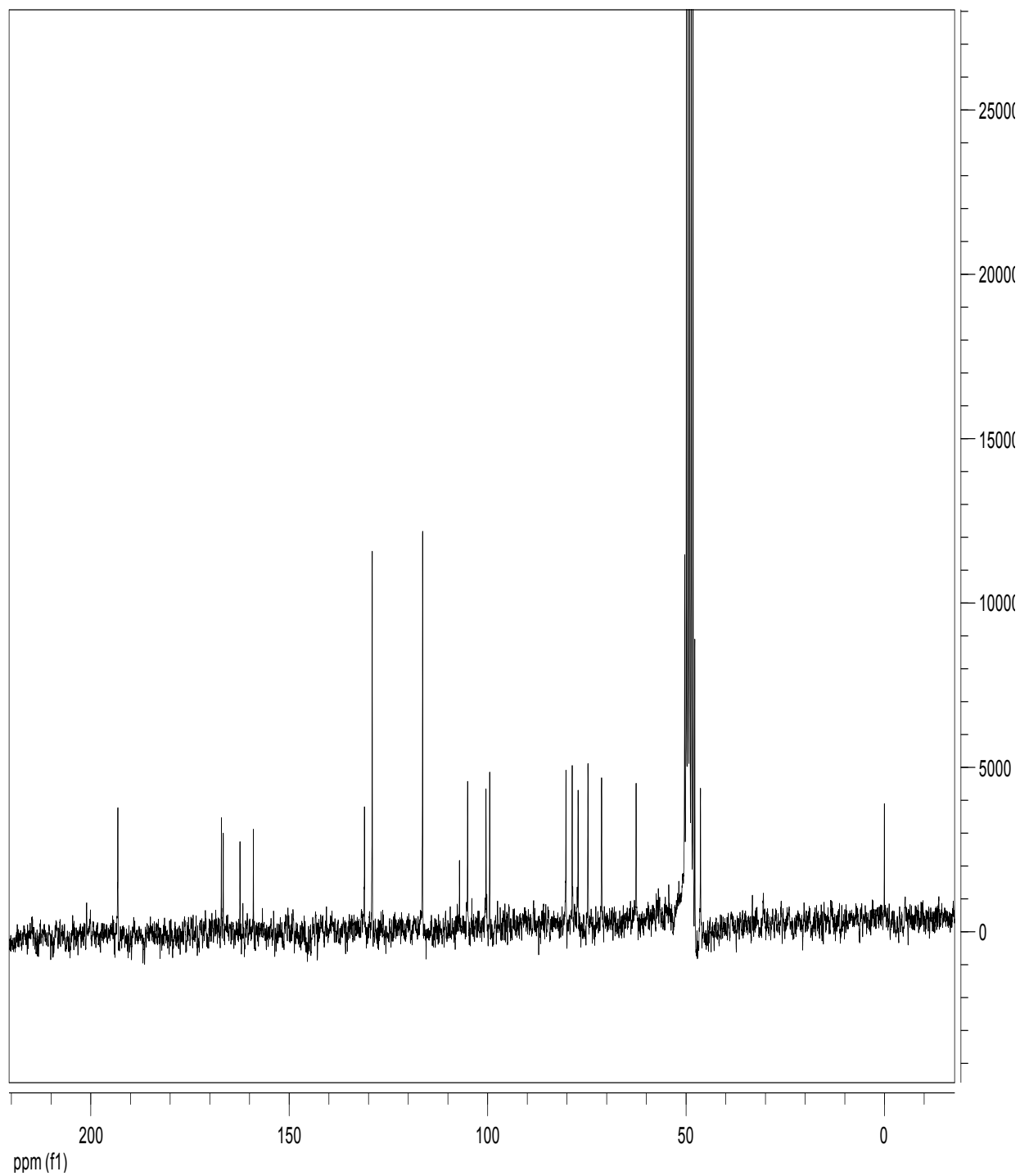


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FAES 9 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz]

TABELA 9 – DADOS DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FAES 9 EM METANOL (300 e 75 MHz, RESPECTIVAMENTE).

Posição	RMN de $^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)	J (Hz) [H acoplado-nº]	Posição C	RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)
2 $\alpha$	5,30 dd	3,0 [H3 $\alpha$ ], 13,0 [H3 $\beta$ ]	2	80,2
3 $\alpha$	2,68 dd	3,0 [H2 $\alpha$ ], 17,4 [H3 $\beta$ ]	3	46,3
3 $\beta$	2,99 dd	13,0 [H2 $\alpha$ ], 17,4 [H3 $\alpha$ ]	4	193,1
			5	162,4
6	6,12 d	2,4 [H8]	6	100,4
			7	166,6
8	6,47 d	2,4 [H6]	8	99,4
			9	167,0
			10	107,1
			1'	131,0
2'	7,30 d	8,6 [H3']	2'	129,0
3'	6,81 d	8,6 [H2']	3'	116,3
			4'	159,0
5'	6,81 d	8,6 [H6']	5'	116,3
6'	7,30 d	8,6 [H5']	6'	129,0
1''	4,77 d	7,2	1''	105,0
2''	3,44 – 3,54 m		2''	74,7
3''	3,44 – 3,54 m		3''	78,6
4''	3,44 – 3,54 m		4''	71,2
5''	3,44 – 3,54 m		5''	77,2
6'' $\alpha$	3,75 dd	4,3 [H5''], 11,6 [H6'' $\beta$ ]	6''	62,5
6'' $\beta$	3,95 dd	6,5 [H5''], 11,6 [H6'' $\alpha$ ]		

### 5.3.2 Fração acetato de etila das folhas

#### 5.3.2.1 Fração acetato de etila remanescente

A fração acetato de etila remanescente das folhas (500 mg), após ser submetida à separação por coluna cromatográfica, apresentou uma mistura de compostos no material cristalizado obtido das frações 72 a 85. Pela submissão deste material à CCD preparativa com cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck, utilizando acetato de etila:acetona:água (25:8:2) como fase móvel, foi possível isolar uma substância

denominada FAER FOL 72 (17 mg). Esta foi submetida à CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), utilizando a fase móvel acetato de etila:água:ácido fórmico (90:5:5), observando-se a sobreposição quando adicionada da substância FAER 20 (obtida da fração acetato de etila das flores), de R<sub>f</sub> 0,22, revelada com o reativo de NEU. Com a determinação do ponto de fusão (172-173 °C), seguida de hidrólise ácida e CCD analítica com os padrões de açúcares e a naringenina, bem como a similaridade nos espectros e deslocamentos obtidos com a realização de espectroscopia de ultravioleta, utilizando os reagentes diagnósticos segundo MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970), conduzem à afirmação de que a substância FAER FOL 72 trata-se também da 5-β-D-glicosil-naringenina (Figura 22).

#### 5.3.2.2 Fração acetato de etila sedimentada:

O material que precipitou quando a fração acetato de etila das folhas foi armazenado em freezer e que foi separado por filtração a vácuo, em funil de vidro sinterizado (G4) e lavado com hexano P.A. gelado em geladeira, correspondeu a 18 mg. Após ser submetida à CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), utilizando a fase móvel acetato de etila:água:ácido fórmico (90:5:5), foi observada a presença de uma substância de R<sub>f</sub> 0,22, denominada de FAES FOL. Pela realização de CCD analítica com a FAES FOL e a FAER 20 (revelada com reativo de NEU), seguida de determinação do ponto de fusão (170-172 °C), demonstrou também se tratar da mesma substância.

#### 5.3.2 Fração diclorometano das flores

Ao submeter 500 mg da fração diclorometano (FDCM) à separação em coluna cromatográfica de silicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck, foram obtidas cristalizações nas frações 10 a 18 (denominada de FDCM 10), 19 a 39 (FDCMS 2) e 40 a 100 (FDCMS 8).

### 5.3.2.1 Material cristalizado nas frações 10 a 18:

O material cristalizado das frações 10 a 18, denominado de FDCM 10, por estar constituído de uma mistura de compostos de Rf próximos, não pode ser purificado, mesmo após realização de CCD preparativa.

### 5.3.2.2 Material cristalizado nas frações 19 a 39:

A substância obtida da reunião das frações 19 a 39, após ter sido purificada através de outras colunas cromatográficas, foi denominada de FDCMS 2 (25 mg).

A Tabela 10 demonstra os deslocamentos no espectro de UV da solução metanólica da substância FDCMS 2 quando submetida aos reagentes diagnósticos descritos em MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970).

TABELA 10 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA DA FRAÇÃO FDCMS 2

Reagente	$\lambda$ nm (log $\epsilon$ )
MeOH	210 (4,26); 289 (4,05); 320 (3,60)
NaOMe	244 (4,00); 322 (4,18)
NaOAc	290 (3,96); 323 (3,92)
NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	289 (4,02); 321 (3,81)
AlCl <sub>3</sub>	311 (4,19); 374 (3,46)
AlCl <sub>3</sub> / HCl	310 (4,22); 371 (3,56)

Os dados da espectroscopia de UV, o ponto de fusão de 250 °C e a comparação de similaridade de CCD analítica com a apresentada pelo padrão de naringenina, conduzem à afirmação de que a substância FDCMS 2 trata-se também da naringenina, já apresentada na Figura 16.

### 5.3.2.3 Material cristalizado nas frações 40 a 100

O material que cristalizou nas frações 40 a 100 da fração diclorometano das flores, após ser submetida à separação cromatográfica por coluna, por apresentar-se em uma mistura de compostos, foi encaminhado para realização de outra coluna cromatográfica, utilizando o mesmo processo anterior. A subfração 8 obtida deste fracionamento, correspondeu a 30 mg de uma substância denominada de FDCMS 8. Esta foi submetida à CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), utilizando a fase móvel acetato de etila:água:ácido fórmico (90:5:5), apresentando R<sub>f</sub> 0,22, revelada com reativo de NEU, indicando a presença de flavonoides.

Após a realização de espectroscopia no ultravioleta, utilizando os mesmos reagentes diagnósticos descritos anteriormente, foram obtidos os dados apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 – PRINCIPAIS COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) NO ESPECTRO DE UV PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA DA FRAÇÃO FDCMS 8

Reagente	$\lambda$ nm (log $\epsilon$ )
MeOH	230 (4,09), 282 (4,10), 320 (3,80)
NaOMe	253 (4,09), 321 (3,88)
NaOAc	252 (3,80), 323 (4,14)
NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	283 (4,12), 330 (3,92)
AlCl <sub>3</sub>	230 (4,13), 283 (4,14), 320 (3,77)
AlCl <sub>3</sub> / HCl	230 (4,15), 282 (4,16), 320 (3,73)

A presença de sobreposição na CCD analítica da substância FDCMS 8 quando adicionada da substância FAER 20 (obtida da fração acetato de etila das flores), idêntico ponto de fusão, bem como a similaridade nos espectros e deslocamentos obtidos com a realização de espectroscopia no ultravioleta, utilizando os reagentes diagnósticos segundo MABRY, MARKHAN e THOMAS (1970), conduzem à afirmação de que a substância FAER FOL 72 trata-se também da 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina (Figura 22).

#### 5.3.4 Fração diclorometano das folhas:

Para a fração diclorometano obtida das folhas, pela presença de mistura de compostos, não houve cristalização em nenhuma das frações coletadas. No entanto, ainda que não tenha sido possível o seu isolamento, pela realização de CCD analítica comparativa utilizando esta fração, a naringenina e a 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina, foram verificadas similaridades de Rfs na fração diclorometano das folhas e estas substâncias.

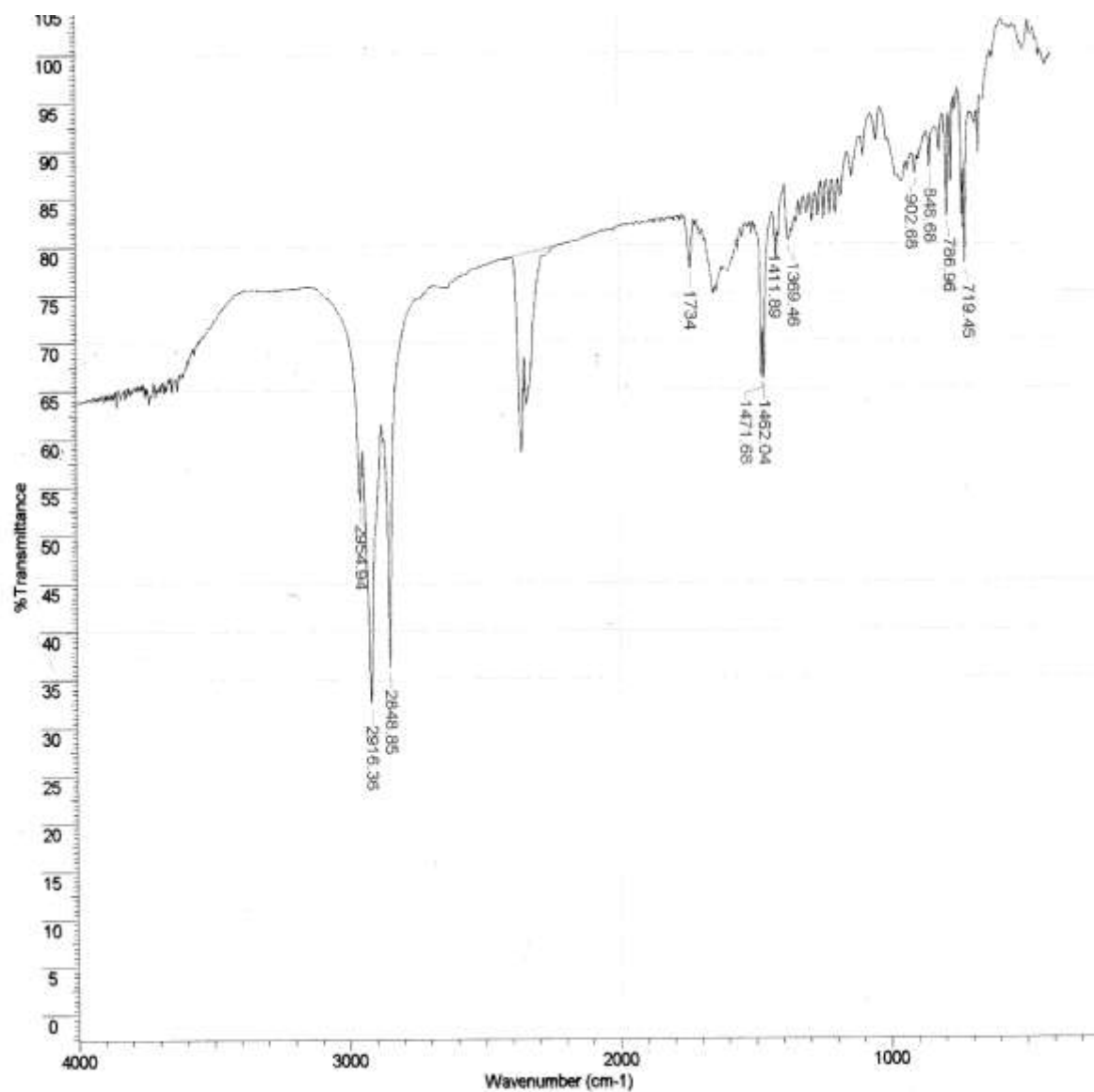
#### 5.3.5 Resíduo do extrato etanólico das flores

Pela cromatografia em coluna do resíduo que precipitou do extrato etanólico das flores, com cristalização de uma substância de coloração branca nas frações 1 a 7 (RES 2,68 g), ao ser submetida à CCD analítica (cromatofolha silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (150:7), demonstrou a presença de uma substância única de Rf 0,43, verificada após revelação com anisaldeído/sulfúrico, após aquecimento.

Pela espectroscopia no infravermelho (Figura 25) foi verificada a presença de carbonila pela banda de média intensidade em 1734  $\text{cm}^{-1}$ , indicativa de função cetona. As bandas entre 2916 e 2848  $\text{cm}^{-1}$  são indicativas da presença de  $\text{CH}_2$ . Há ainda uma banda indicativa de  $\text{CH}_3$  em 2954  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise do espectro de absorção na região do ultravioleta desta substância dissolvida em hexano (1 mg/100 mL), em uma varredura realizada entre 200 a 360 nm, demonstrou uma absorção máxima em 273 nm ( $\epsilon = 3,77$ ), demonstrado na Figura 26.

Os espectros e os dados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT) estão demonstrados nas Figuras 27, 28 e 29 e na Tabela 12.



No	cm-1	%T	Intensity
1	719.45	77.968	M
2	786.96	82.745	W
3	848.68	87.938	W
4	902.68	87.298	W
5	1369.46	80.338	M
6	1411.89	81.179	W
7	1462.04	66.012	M
8	1471.68	66.042	M
9	1734.00	77.510	M
10	2848.85	36.154	S
11	2916.36	32.443	VS
12	2954.94	53.370	S

FIGURA 25 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO OBTIDO PARA A SUBSTÂNCIA RES

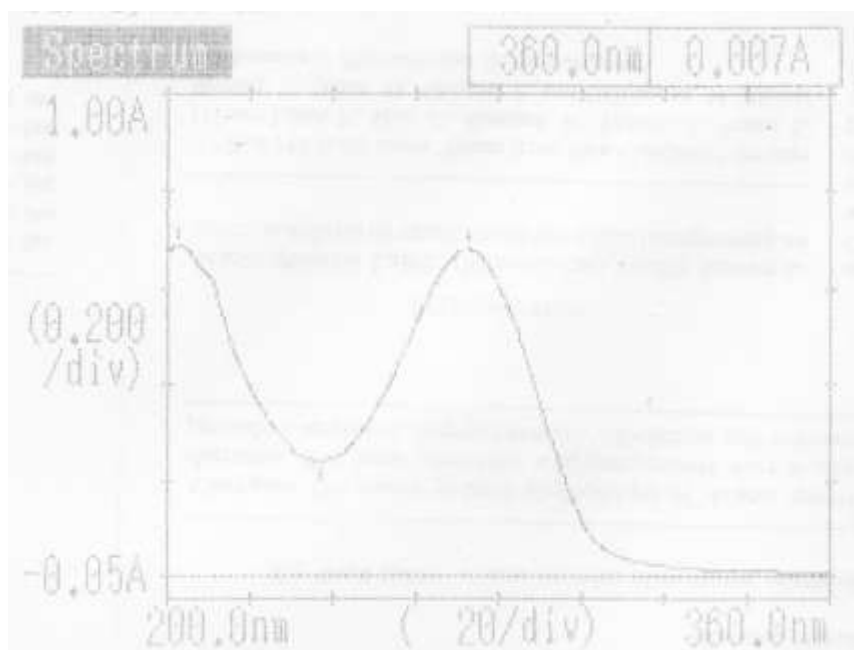


FIGURA 26 – ESPECTRO DE VARREDURA NO UV (200 A 360 NM) DA SOLUÇÃO HEXÂNICA (1MG/100 ML) DA SUBSTÂNCIA RES



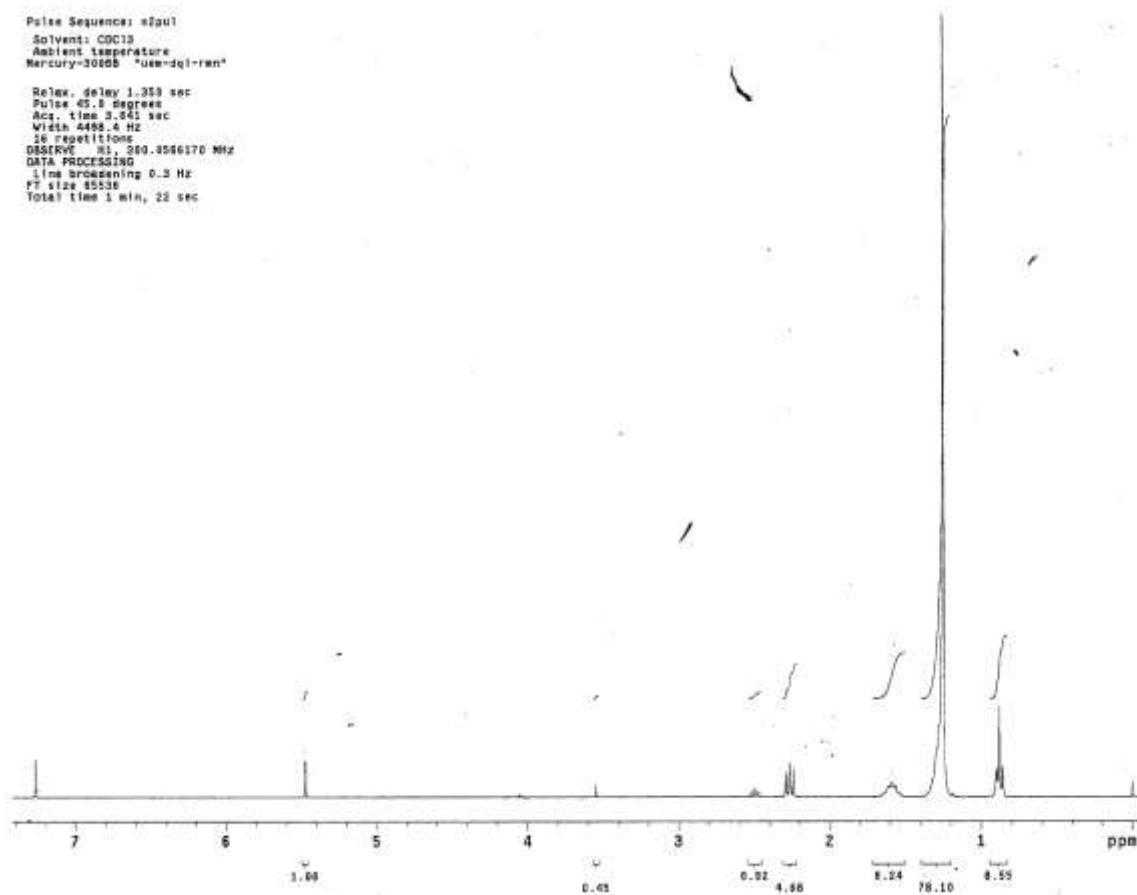
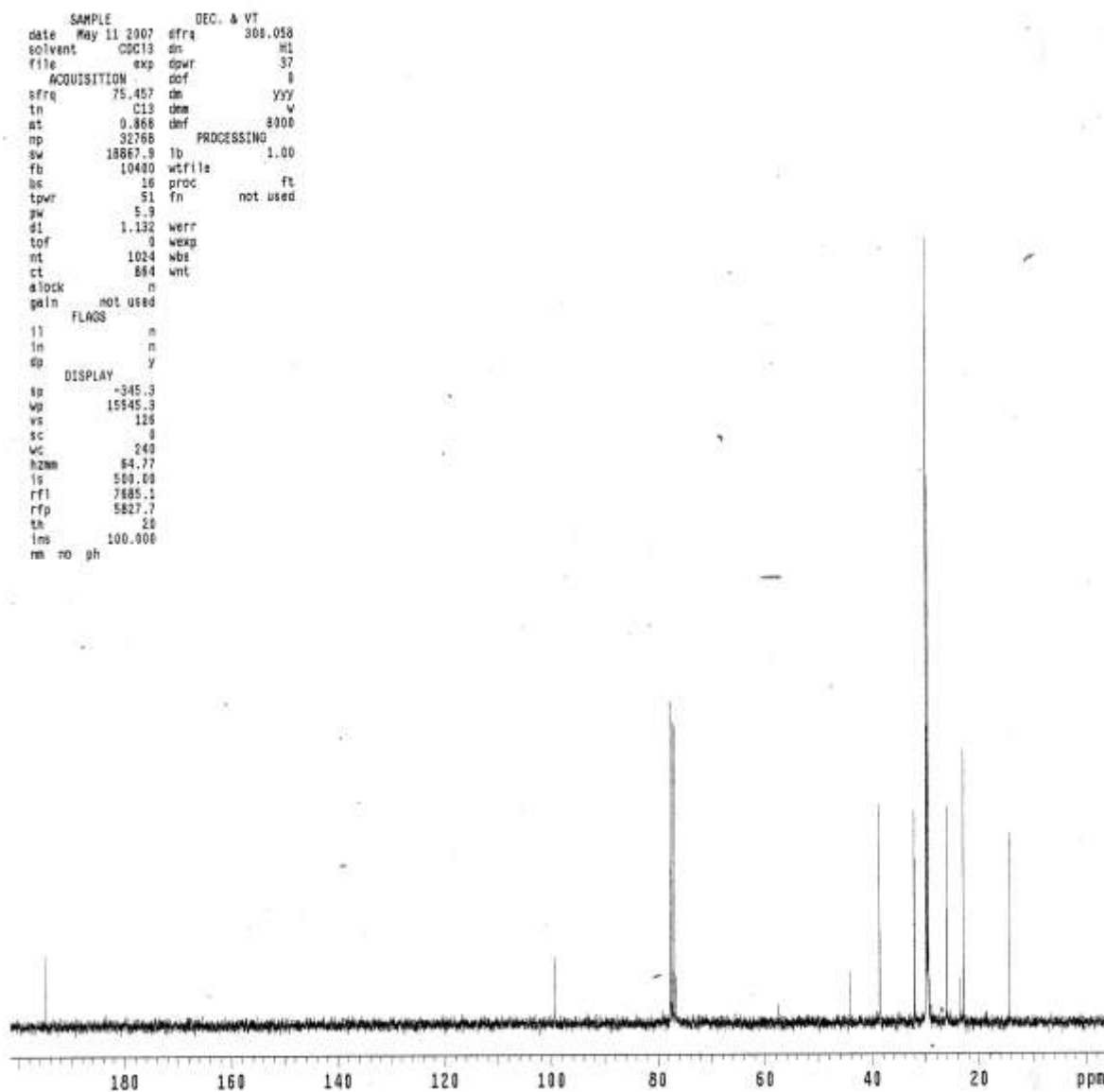


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA RES [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz]

FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DA SUBSTÂNCIA RES [CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz]

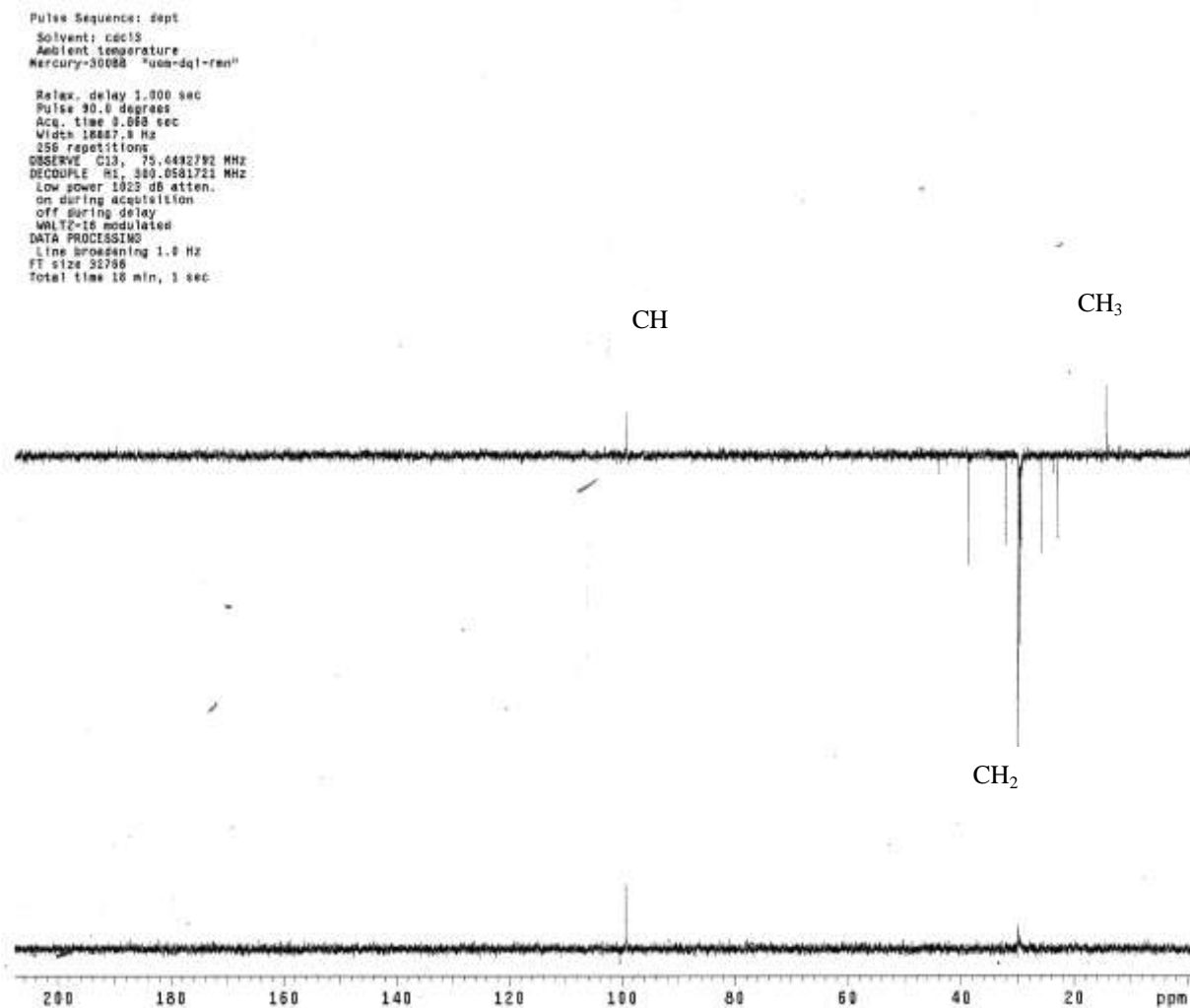
FIGURA 29 – ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA RES [CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz]

TABELA 12 - DADOS DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA RES, EM CLOROFÓRMIO

Posição	RMN de $^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)	J (Hz) [H acoplado]	Posição	RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)
1; 33	0,85 t	6,6 [H2 e 32]	1; 33	14,3
2; 32	1,25 m		2; 32	22,9
3; 31	1,25 m		3; 31	23,6
4; 30	1,25 m		4; 30	25,9
5; 29	1,25 m		5; 29	29,2
6; 28	1,25 m		6; 28	29,4
7; 27	1,25 m		7; 27	29,5
8; 26	1,25 m		8; 26	29,6
9; 25	1,25 m		9; 25	29,7
10; 24	1,25 m		10; 24	29,7
11; 23	1,25 m		11; 23	29,8
12; 22	1,25 m		12; 22	29,8
13; 21	1,25 m		13; 21	29,9
14; 20	1,54 m		14; 20	32,1
15; 19	2,24 t (a) 2,47 t (b)	7,2 [H14 e 20] 7,2 [H14 e 20]	15; 19	38,6 (a); 44,0 (b)
			16; 18	194,8
17	3,54s (b); 5,47s (a)		17	56,5 (b); 99,2 (a)

Legenda: a (tautomeria, apresentando a forma enol); b (tautomeria, apresentando a forma cetona).

Comparando-se os dados obtidos nos espectros com os demonstrados em literatura (HORN; LAMBERTON, 1962; HORN; KRANZ; LAMBERTON, 1964 e PEREIRA *et al.*, 2005) e a verificação do pequeno número de sinais obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , sugerem que haja simetria molecular na estrutura.

A presença de carbonila indicada no IV foi confirmada pelo sinal em 194,8 ppm, relacionado aos carbonos C-16 e 18, sinal este ausente no espectro de DEPT.

Pela análise dos espectros de RMN foi verificada a presença de tautomerismo cetona-enólica. Ainda que a forma cetônica seja termodinamicamente mais estável que a enólica, nas  $\beta$ -dicetonas, no entanto, a forma enólica é predominante.

A tautomeria no C-15 e 19 (conjuntamente com as carbonilas dos carbonos 16 e 18, caracterizadas em  $\delta$  194 ppm), conduziu à obtenção de sinais característicos para as formas enol (tripleto em  $\delta$  2,24 e pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  38,6 ppm) e cetona (tripleto em  $\delta$  2,47 e pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  em 44,0 ppm), também refletida nos sinais do C-17

(singlete em  $\delta$  5,47 e pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  em 56,5 ppm para a forma cetona e pelo singlete em  $\delta$  3,54 e pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  em 99,2 para a forma enol. Este sinal do C-17 em  $\delta$  99,2 ppm pode ser identificado no espectro de DEPT como característico para carbonos do tipo CH presente neste quando na forma enol.

A presença de metila, relacionada ao C-1 e C-33, foi evidenciada pelos sinais em  $\delta$  0,85 (tripleto) e 14,35 ppm, cuja presença foi também evidenciada no DEPT. Os  $\text{CH}_2$  verificados dos carbonos 2 a 14 e 20 a 32 foram demonstrados pelos multipletes em  $\delta$  1,25 e 1,54 ppm e pelos sinais entre  $\delta$  22,9 a 32,1 ppm, também evidenciados no DEPT.

Os dados obtidos nas espectroscopias no UV, IV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e o ponto de fusão (65 °C) para a substância avaliada, quando comparados aos apresentados em literatura por HORN e LAMBERTON (1962), HORN, KRANZ e LAMBERTON (1964) e PEREIRA *et al.* (2005), permitem determinar que esta seja a  $\beta$ -dicetona intitulada 16,18-tritriacontanodiona, também denominada de n-tritriacontan-16,18-diona (Figura 30). Esta substância já havia sido obtida da cera das folhas da *Acacia podalyriifolia* por HORN e LAMBERTON (1962) e por HORN, KRANZ e LAMBERTON (1964).

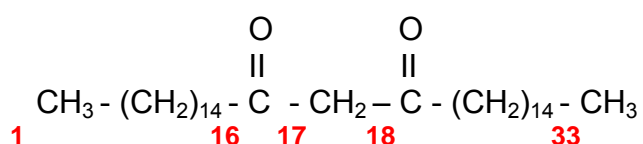


FIGURA 30 – ESTRUTURA QUÍMICA DE 16,18-TRITRIACONTANODIONA

### 5.3.6 Resíduo do extrato etanólico das folhas

Para o resíduo que precipitou do extrato etanólico das folhas e que foi submetido à cromatografia em coluna, com cristalização de uma substância de coloração branca nas frações 1 a 4 (RES FOL 634 mg), a realização de CCD analítica, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (150:7), demonstrou a presença de uma substância única também de  $R_f$  0,43, verificada após revelação com anisaldeído/sulfúrico, com

aquecimento. Ao realizar CCD analítica entre esta e a substância isolada do resíduo das flores (RES), bem como determinação do ponto de fusão (PF: 65 °C) e análise espectroscópica no ultravioleta da sua solução hexânica a 1mg/100 mL (absorção máxima em 274 nm,  $\epsilon = 4,04$ ), indicaram tratar-se da mesma substância.

### 5.3.7 Fração hexânica das flores

A fração hexânica das flores (3g), após ser submetida à separação cromatográfica em coluna de silicagel, resultou em cristalizações entre as frações 1 a 13.

Com a realização de CCD analítica, utilizando hexano:acetato de etila (150:7) como fase móvel (Rf 0,43), visualizada após revelação com anisaldeído/sulfúrico, com aquecimento, seguida da determinação do seu ponto de fusão (65 °C) e da análise espectroscópica de ultravioleta (apresentando um máximo de absorção em 273 nm,  $\epsilon = 4,25$ ), foi verificado que a substância originária das frações 1 a 13, denominado de FHEX FLOR 1 (12 mg), resultante da separação em coluna cromatográfica da fração hexânica das flores, correspondia à mesma obtida dos precipitados dos extratos etanólicos (RES).

### 5.3.8 Fração hexânica das folhas

Ao utilizar 2,5 g da fração hexânica das folhas para separação cromatográfica em coluna de silicagel, foram obtidas 37 mg de uma substância que cristalizou entre as frações 1 a 10, denominada de FHEXFOL 1. A realização da CCD analítica para esta substância, utilizando fase móvel hexano:acetato de etila (150:7) e revelação com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com aquecimento, na qual foi também acrescentada a substância obtida da FHEX FLOR1 (para comparação de sobreposição), aliada à determinação do ponto de fusão (65 °C), permitiram estabelecer que esta se refere também à 16,18-tritriacontanodiona isolada previamente do resíduo dos extratos etanólicos e da fração hexânica das flores.

## 5.4 TEOR DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NAS FRAÇÕES E NO VEGETAL

A Tabela 13 apresenta o teor das substâncias isoladas 16,18-tritriacontanodiona, naringenina e 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina nas flores e nas folhas.

TABELA 13 – TEOR DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NAS FRAÇÕES E NO MATERIAL VEGETAL TRABALHADO (FLORES E FOLHAS)

Fração original	Rendimento nas frações (g% p/p) para as substâncias			Rendimento na flor ou folha (mg/g) para as substâncias		
	1	2	3	1	2	3
RESÍDUO FLOR	17,87	—	—	18,27	—	—
RESÍDUO FOLHA	9,06	—	—	4,91	—	—
FHEX FLOR	0,4	—	—	0,098	—	—
FHEX FOLHA	1,5	—	—	0,88	—	—
FDCM FLOR	—	5,0	6,0	—	0,23	0,28
FDCM FOL	—	—	—	—	—	—
FAE FLOR	—	0,14	9,9	—	0,047	4,18
FAE FOLHA	—	—	7,0	—	—	2,11
	<b>TOTAL FLOR</b>			<b>18,36</b>	<b>0,277</b>	<b>4,46</b>
	<b>TOTAL FOLHA</b>			<b>5,79</b>	—	<b>2,11</b>

Legenda: RESÍDUO (material que precipitou na obtenção do extrato etanólico das flores e das folhas); FHEX (fração hexânica das flores e das folhas); FDCM FLOR (fração diclorometano das flores e das folhas); FAE (fração acetato de etila das flores e das folhas); 1: 16,18-tritriacontanodiona; 2: naringenina; 3: 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina.

Tanto para as flores como para as folhas de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, houve predominância da 16,18-tritriacontanodiona, resultante majoritariamente dos resíduos que precipitaram na obtenção dos extratos etanólicos, correspondendo a 17,87 e 9,06% destes resíduos, respectivamente, e a 18,36 mg/g de flor e 5,79 mg/g de folha (Tabela 13).

A 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina, obtida principalmente das frações acetato de etila das flores e das folhas, representando 9,9 e 7% destas frações, respectivamente (foi o composto fenólico isolado em maior concentração nestes materiais, confirmando os relatos em literatura de ser este gênero uma importante fonte destas substâncias (KERBER, 1988; KERBER; SILVA, 1993; ANDRADE *et al.*, 2003; MEERA *et al.*, 2005). Conforme demonstrado por ZUANAZZI (1999), a predominância dos compostos fenólicos na forma heterosídica, em detrimento da forma livre (aglicona) é comumente verificada na análise destes produtos, relacionada ao fato da maior polaridade apresentada quando ligados ao açúcar, o que explicaria a maior concentração da naringenina glicosilada (4,46 mg/g de flor e 2,11 mg/g de folha), em relação à sua aglicona (0,047 mg/g de flor).

Os teores obtidos das flavanonas isoladas (naringenina aglicona e seu heterosídeo) estão condizentes com os demonstrados por SILVA (2001), que estudou estes compostos na *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO

A determinação do conteúdo de compostos polifenólicos, utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, baseia-se na reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, em meio alcalino, a óxidos de tungstênio e molibdênio, pelos compostos fenólicos presentes no material analisado, formando um complexo de coloração azul, que apresenta absorção máxima em 760 nm (KUJALA *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2005; MEDA *et al.*, 2005).

O conteúdo de polifenóis das flores e das folhas foi determinado através do reativo de Folin Ciocalteu usando a equação obtida por regressão linear nos ensaios com o padrão de ácido gálico ( $R^2 = 0,9945$ ).

As amostras obtidas das flores apresentaram-se com os maiores teores de compostos fenólicos, sendo destaque a fração acetato de etila ( $33,85 \pm 1,52$  mg % de ácido gálico), seguido pela fração diclorometano ( $24,02 \pm 2,20$ ), extrato etanólico ( $20,64 \pm 2,69$ ) e a fração hexânica ( $14,33 \pm 0,26$ ).



Para as folhas, foi também a fração acetato de etila que apresentou o resultado mais expressivo ( $22,9 \pm 1,57$  mg % de ácido gálico), seguido da fração diclorometano ( $16,74 \pm 0,265$ ), extrato etanólico ( $15,14 \pm 0,61$ ) e fração hexânica ( $14,69 \pm 0,081$ ).

Os elevados teores de compostos fenólicos verificados tanto para as flores quanto para as folhas de *A. podalyriifolia* confirmam os relatos em literatura de ser o gênero *Acacia* uma importante fonte destes compostos, como foi demonstrado nos trabalhos de revisão de ANDRADE *et al.* (2003 a), SEIGLER (2003) e MEERA; CHANDER; KALIDHAR (2005) e que poderiam estar influenciando nas atividades biológicas avaliadas neste trabalho.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a verificação da atividade antibacteriana do extrato etanólico, das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e das folhas e das substâncias isoladas, foram empregadas as técnicas de bioautografia, difusão em disco e macrodiluição em caldo na determinação da concentração inibitória mínima. As cepas gram positivas utilizadas nos ensaios foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12229), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e as gram negativas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), adquiridas da Newprov® em discos esterilizados e reconstituídas conforme recomendações do fabricante. Estas cepas foram escolhidas por serem comumente utilizadas nestas avaliações.

### 5.6.1 Bioautografia

Utilizando a bioautografia, nas concentrações das amostras avaliadas (12,5 µg/ µL), foram verificadas zonas de inibição do crescimento para as flores e para as folhas.

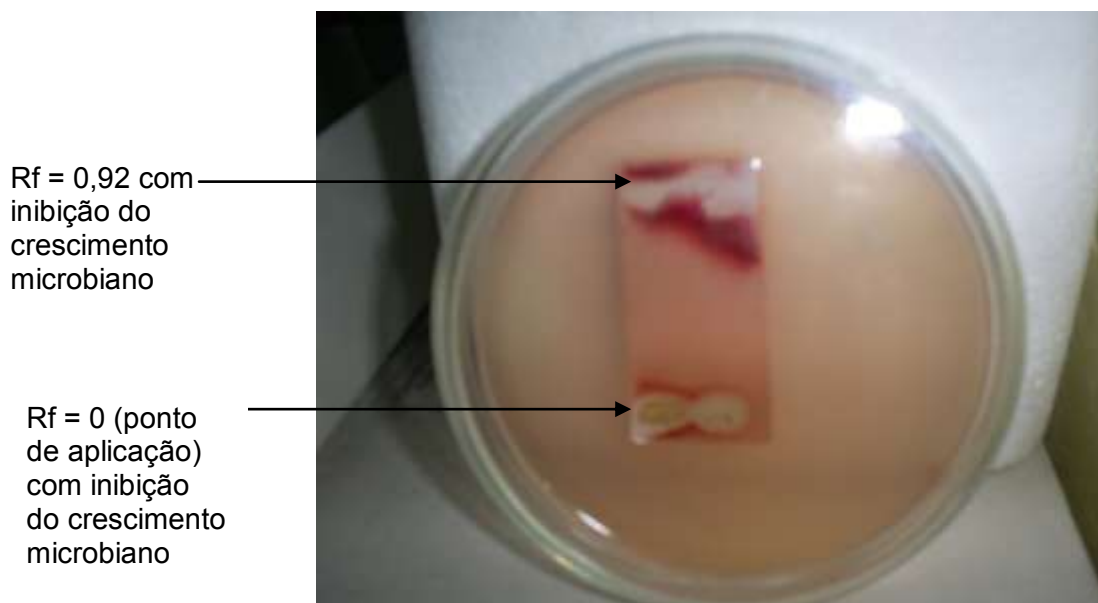
Para as flores, as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila demonstraram zonas de inibição do crescimento microbiano nos bioautogramas tanto para as amostras cujas CCDs foram desenvolvidas com a fase móvel, como também para aquelas que não foram submetidas à fase móvel. Esta etapa foi realizada para verificar se haveria diferenças nos resultados para a fração completa que foi adicionada na base da CCD, como também para identificar os Rf das possíveis substâncias que apresentassem atividade.

Para as flores, o extrato etanólico apenas apresentou atividade para estas mesmas cepas quando a amostra foi aplicada à CCD sem ser submetida à fase móvel. Com as frações hexânica (base) e diclorometano (base e Rf 0,58, correspondendo à naringenina) foram obtidas zonas de inibição de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, utilizando fase móvel clorofórmio:metanol 90:10. Para a fração acetato de etila, quando utilizada a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico:água 90:5:5, foram observadas zonas de inibição do crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* no ponto de aplicação da amostra na CCD (base).

Com as folhas, o extrato etanólico inibiu apenas a cepa de *Staphylococcus epidermidis* enquanto que não foi verificada atividade com este ensaio para a fração hexânica. A fração diclorometano das folhas inibiu somente o crescimento de *S. epidermidis* e quando não submetida à fase móvel. Com a fração acetato de etila, houve presença de zonas de inibição do crescimento microbiano para todas as cepas testadas, exceto para *Escherichia coli*, porém somente verificada quando não foi submetida à fase móvel, ou seja, sem houvesse a separação das substâncias que a compõe, provavelmente devido ao efeito sinérgico entre estas.

Pela autobiografia, para as substâncias isoladas das frações das flores, apenas a naringenina apresentou zonas de inibição microbiana e somente para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

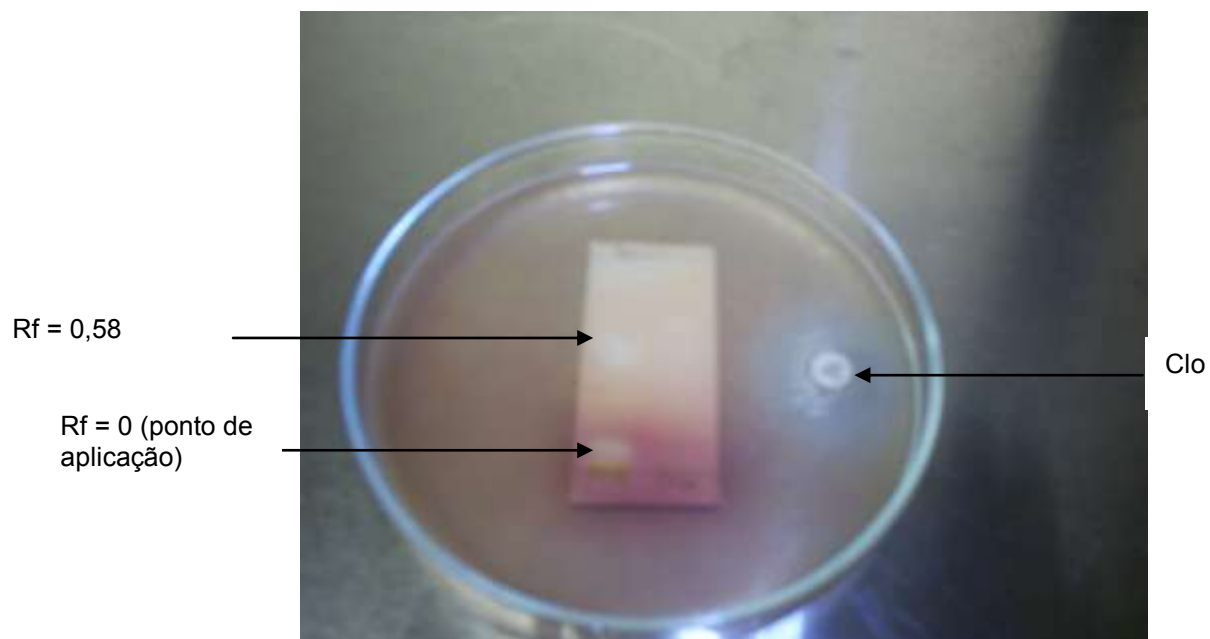
Os resultados obtidos na bioautografia estão representados na Tabela 14 e nas Figuras 31, 32 e 33.



FDCM NAR  
Fase móvel: AcEt: HCOOH: H<sub>2</sub>O (90:5:5)

Legenda: FDCM (fração diclorometano); NAR (naringenina); AcEt (acetato de etila), HCOOH (ácido fórmico), H<sub>2</sub>O (água)

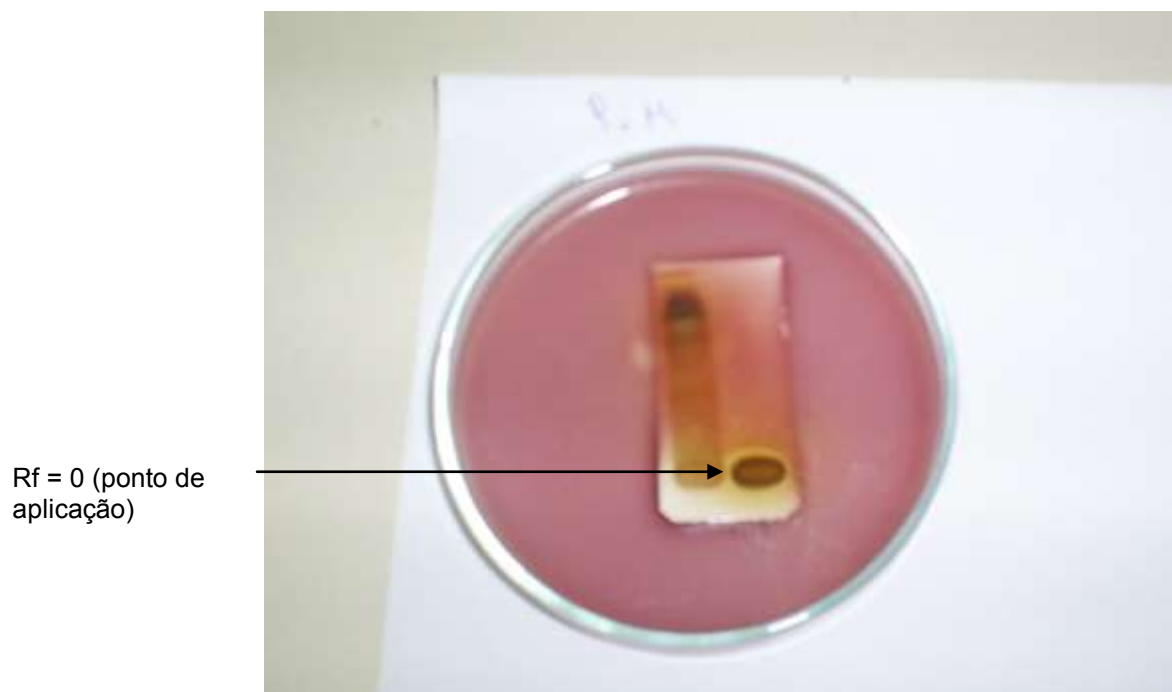
FIGURA 31 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FDCM FLOR E DA SUBSTÂNCIA NARINGENINA EM *Staphylococcus aureus*, POR BIOAUTOGRAFIA, FASE MÓVEL 1



FDCM NAR  
Fase móvel:  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (90:10)

Legenda: FDCM (fração diclorometano), NAR (naringenina), Clo (cloranfenicol 0,03 mg/disco),  $\text{CHCl}_3$  (clorofórmio), MeOH (metanol).

FIGURA 32 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FDCM FLOR E DA SUBSTÂNCIA NAR EM *Staphylococcus aureus*, POR BIOAUTOGRAFIA, FASE MÓVEL 2



FAE1 FAE2  
Fase móvel: AcEt: HCOOH: H<sub>2</sub>O (90: 5: 5)

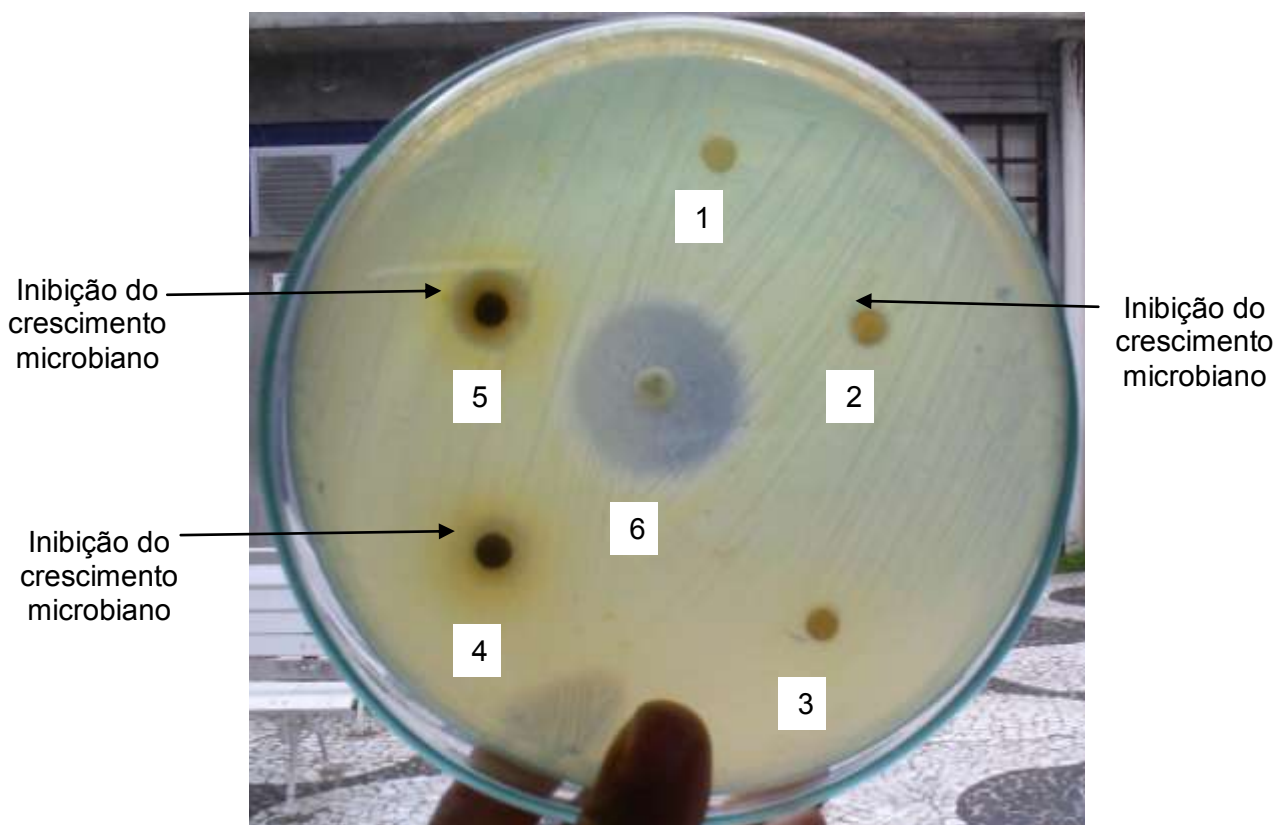
Legenda: FAE1 (fração acetato de etila desenvolvida com a fase móvel); FAE2 (fração acetato de etila sem ser submetida à fase móvel).

FIGURA 33- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FAE FLOR *Proteus mirabilis*, POR BIOAUTOGRAFIA

### 5.6.2 Difusão em disco

Para as flores, o extrato etanólico e as frações hexânica e diclorometano exibiram zonas de inibição do crescimento para as cepas gram positivas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, enquanto que a fração acetato de etila inibiu estas cepas e também *Streptococcus pyogenes* as cepas gram negativas de *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, conforme está representado na Tabela 15 e Figura 34. No entanto, não foram observadas zonas de inibição do crescimento microbiano das cepas avaliadas com as substâncias isoladas, nas concentrações empregadas nos ensaios (1 e 0,5 mg/disco).

Para as folhas, o extrato etanólico inibiu apenas *S. epidermidis* com 1 mg desta amostra. As frações hexânica e diclorometano não demonstraram atividade nas concentrações avaliadas. A fração acetato de etila inibiu as cepas avaliadas, exceto *S. pyogenes* e *E. coli*, utilizando 1 ou 0,5 mg/disco, dependendo da cepa. Os resultados estão demonstrados na Tabela 15.



Legenda: FAE FOL (fração acetato de etila das folhas), FHEX FLOR (fração hexânica das flores), 1: disco com os solventes empregados (metanol e hexano); 2: fração hexânica das flores a 1 mg/disco; 3: fração hexânica das flores a 0,5 mg/disco; 4: fração acetato de etila a 0,5 mg/disco; 5: fração acetato de etila a 1 mg/disco; 6: cloranfenicol a 0,03 mg/disco.

FIGURA 34 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FAE FOL E HEX FLOR EM *Staphylococcus aureus*, POR DIFUSÃO EM DISCO

### 5.6.3 Concentração inibitória mínima

Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) é definida como a menor concentração que inibe o crescimento microbiano *in vitro* (KONEMAN *et al.*, 1992), verificado pela ausência de turvação nos tubos de ensaio contendo o caldo tríptico de soja, a amostra e a bactéria avaliada.

Para as flores, foi verificado que houve inibição do crescimento das mesmas cepas e amostras similarmente ao obtido com a difusão em disco, destacando-se a fração acetato de etila frente a *S. aureus* e *S. epidermidis* (CIM=0,25 mg/mL), *S. pyogenes* (CIM=0,5 mg/mL), *K. pneumoniae* (CIM=0,5 mg/mL) e *P. mirabilis* (CIM=0,5 mg/mL). Entretanto, para as substâncias isoladas, somente foi observado efeito inibitório do crescimento bacteriano para a naringenina, apresentando CIM de 2 mg/mL, para estas mesmas cepas, conforme descritos na Tabela 16 e Figura 35.

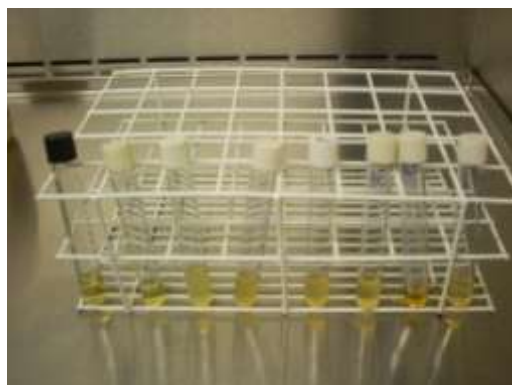
As amostras obtidas das folhas também demonstraram atividade antibacteriana, com a fração acetato de etila apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 2mg/mL para as cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Proteus mirabilis*, 1 mg/mL para *S. aureus* e *S. typhimurium* e 0,5 mg/mL para *S. epidermidis* (Figura 36).



Tubos: 1 2 3 4 5 6 7 8

Legenda: Tubo 1 (controle de crescimento microbiano); tubos 2 a 7 (NARGLI: 5-β-D-glicosil naringenina a 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,075 mg/mL, respectivamente); 8 (controle de ausência de crescimento microbiano).

FIGURA 35 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA NARGLI EM *Staphylococcus aureus*.



Tubos: 1 2 3 4 5 6 7 8  
 Legenda: Tubos 1 a 6 (FAE, fração acetato de etila a 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,075 mg/mL, respectivamente); 7 (controle de ausência de crescimento microbiano, sem turvação); 8 (controle de crescimento microbiano, presença de turvação).

FIGURA 36- AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA FAE DAS FOLHAS EM *Staphylococcus aureus*.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antibacteriana (bioautografia, difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima) permitiram observar a presença de atividade antibacteriana contra cepas gram positivas e gram negativas tanto para as flores como para as folhas.

A inibição do crescimento bacteriano observada na bioautografia pela substância de Rf = 0,58, (fase móvel clorofórmio:metanol 90:10), semelhante ao apresentado pela naringenina, foi confirmada na determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM). A presença desta substância na fração diclorometano e acetato de etila pode estar contribuindo na ação antibacteriana observada por estas frações.

A fração acetato de etila, tanto das flores como das folhas, demonstrou ser a mais ativa das amostras analisadas, o que havia também sido verificado para a *Acacia longifolia* (Andr.) Willd por SILVA (2001), PEITZ (2003) e PEITZ *et al.* (2003). Ainda que a naringenina e seu heterosídeo (5- $\beta$ -D-glicosil naringenina) tenham sido detectados nesta fração, não foram obtidas zonas de inibição do crescimento para nenhuma das cepas avaliadas referentes aos Rfs apresentados por estas substâncias



na bioautografia. Além disto, a 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina que foi isolada predominantemente desta fração, não apresentou efeito antibacteriano, nas concentrações avaliadas, em nenhuma das metodologias empregadas. Estes resultados também foram relatados no trabalho realizado por CÈSPEDES *et al.* (2006), que avaliou a atividade antibacteriana de diversos compostos, dentre os quais a naringenina aglicona e seu heterosídeo glucosil-O-ramnosil. Dentre as possíveis justificativas para este efeito estariam a concentração empregada não suficiente para promover uma inibição mais efetiva do crescimento dos microorganismos empregados, bem como que outras substâncias presentes em menor quantidade na fração acetato de etila, detectadas na triagem fitoquímica e que não foram isoladas desta (possivelmente compostos fenólicos), poderiam estar contribuindo nos resultados obtidos, como ocorreu com as amostras de *Acacia salicina* descritas por CHATTI *et al.* (2009). Ou ainda, estaria ocorrendo um sinergismo entre estas, conforme foi descrito por CÈSPEDES *et al.* (2006) e CHATTI *et al.* (2009). Segundo CÈSPEDES *et al.* (2006), o efeito sinérgico é considerado uma das mais importantes características exibidas pelos extratos naturais, aumentando a eficácia destes em relação aos seus produtos isolados.

TABELA 14 - TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR BIOAUTOGRAFIA

Amostra	Amostra Rf (inibição microbiana) e Fase móvel utilizada	Microorganismos								
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhimurium</i>	
EE1 FLOR	___; a	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
EE2 FLOR	Base (0)	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
EE1 FOL	___; a	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
EE2 FOL	Base (0)	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FDCM1 FLOR	Base (0); 0,58; b	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FDCM2 FLOR	Base (0)	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FDCM1 FOL	___; b	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FDCM2 FOL	Base (0)	AI	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FAE1 FLOR	Base (0); a	I	I	I	AI	I	AI	I	AI	AI
FAE2 FLOR	Base (0)	I	I	I	AI	I	AI	I	AI	AI
FAE1 FOL	___; a	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FAE2 FOL	Base (0)	I	I	I	AI	I	I	I	I	I
FHEX1 FLOR	Base (0); b	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FHEX2 FLOR	Base (0)	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FHEX1 FOL	___; b	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
FHEX2 FOL	Base (0)	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
NAR	0,58; b	I	I	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
NARGLI	0,22; a	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI
RES	1,00; a	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI

Legenda: a (fase móvel de acetato de etila: ácido fórmico: água 90:5:5), b (fase móvel de clorofórmio:metanol 90:10), base (ponto de aplicação da amostra na CCD), I (inibição microbiana), AI (ausência de inibição), EE1 FLOR (extrato etanólico das flores submetido à fase móvel), EE2 FLOR (extrato etanólico das flores não submetido à fase móvel), EE1 FOL (extrato etanólico das folhas submetido à fase móvel), EE2 FOL (extrato etanólico das folhas não submetido à fase móvel), FDCM1 FLOR (fração diclorometano flores submetida à fase móvel), FDCM2 FLOR (fração diclorometano flores não submetida à fase móvel), FDCM1 FOL (fração diclorometano folhas submetida à fase móvel), FDCM2 FOL (fração diclorometano folhas não submetida à fase móvel), FAE1 FLOR (fração acetato de etila flores submetida à fase móvel), FAE2 FLOR (fração acetato de etila flores não submetida à fase móvel), FAE1 FOL (fração acetato de etila folhas submetida à fase móvel), FAE2 FOL (fração acetato de etila folhas não submetida à fase móvel), FHEX1 FLOR (fração hexânica flores submetida à fase móvel), FHEX2 FLOR (fração hexânica flores não submetida à fase móvel), FHEX1 FOL (fração hexânica folhas submetida à fase móvel), FHEX2 FOL (fração hexânica folhas não submetida à fase móvel), NAR (naringenina), NARGLI (5-β-D-glicosil naringenina), RES (16, 18 tritriacontanodiona).

TABELA 15 - TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DIFUSÃO EM DISCO

Amostra	Concentração (mg/disco)	Zona de inibição do crescimento (mm de diâmetro)							
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhimurium</i>
EE FLOR	1; 0,5	8; _	17; 12	;	;	;	;	;	;
EE FOL	1; 0,5	;	8; _	;	;	;	;	;	;
FDCM FLOR	1; 0,5	;	10; _	;	;	;	;	;	;
FDCM FOL	1; 0,5	;	;	;	;	;	;	;	;
FAE FLOR	1; 0,5	12; 10	20; 17	8; _	;	8; _	;	8; _	;
FAE FOL	1; 0,5	18; 13	19; 13	;	;	8; _	13; 10	8; _	13; 8
FHEX FLOR	1; 0,5	7; _	10; _	;	;	;	;	;	;
FHEX FOL	1; 0,5	;	;	;	;	;	;	;	;
NAR	1; 0,5	;	;	;	;	;	;	;	;
NARGLI	1; 0,5	;	;	;	;	;	;	;	;
RES	1; 0,5	;	;	;	;	;	;	;	;
CLO	0,030	25	34	10	12	28	13	22	25

Legenda: EE FLOR (extrato etanólico das flores), EE FOL (extrato etanólico das folhas), FDCM FLOR (fração diclorometano das flores), FDCM FOL (fração diclorometano das folhas), FAE FLOR (fração acetato de etila das flores), FAE FOL (fração acetato de etila das folhas), FHEX FLOR (fração hexânica das flores), FHEX FOL (fração hexânica folhas), NAR (naringenina), NARGLI (5-β-D-glicosil naringenina), RES (16, 18 tritriacontanodiona), CLO (disco padrão de cloranfenicol), \_ (ausência de inibição).

TABELA 16 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Amostra	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)							
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhimurium</i>
EE FLOR	1	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2
EE FOL	>2	2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
FDCM FLOR	>2	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2
FDCM FOL	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
FAE FLOR	0,5	0,125	1	>2	1	>2	1	>2
FAE FOL	1	0,5	2	>2	2	>2	2	1
FHEX FLOR	>2	2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
FHEX FOL	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
NAR	2	2	2	>2	2	>2	2	>2
NARGLI	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
RES	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2

Legenda: EE FLOR (extrato etanólico das flores), EE FOL (extrato etanólico das folhas), FDCM FLOR (fração diclorometano das flores), FDCM FOL (fração diclorometano das folhas), FAE FLOR (fração acetato de etila das flores), FAE FOL (fração acetato de etila das folhas), FHEX FLOR (fração hexânica das flores), FHEX FOL (fração hexânica folhas), NAR (naringenina), NARGLI (5-β-D-glicosil naringenina), RES (16, 18 tritriacontanodiona).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na avaliação da atividade antioxidante foi realizada a determinação da capacidade antioxidante total através do método de complexação do fosfomolibdênio, a ação captadora (seqüestrante) do radical livre DPPH (2,2 - difenil - 1 - picril hidrazina) e a captação de radicais peroxila pelo teste TBARS.

### 5.7.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

As amostras analisadas (extrato etanólico, frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores e folhas, as substâncias isoladas e os padrões de rutina e ácido ascórbico) promoveram alteração da coloração inicialmente amarela da solução teste, para verde, com a formação do complexo fosfomolibdênio, pela ação dos antioxidantes presentes nas amostras, em graus variados, conforme demonstrado na Tabela 17.

Tanto para as flores como para as folhas, destaque especial apresentou a fração acetato de etila, demonstrando ser com esta metodologia mais ativa que o padrão de rutina. No entanto, as substâncias naringenina e 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina obtidas desta fração, apresentaram-se com atividade antioxidante relativa reduzida, o que também foi observado com a naringenina, obtida das frações acetato de etila e diclorometano.

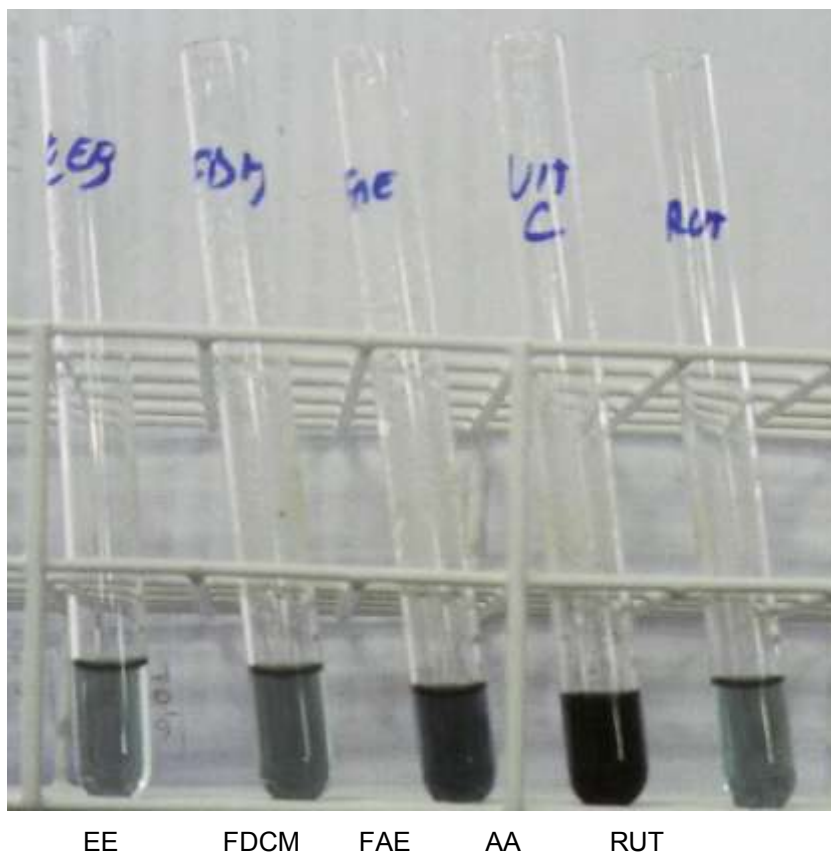
As amostras analisadas das folhas também apresentaram atividade antioxidante relativa superior ao padrão de rutina, com destaque para as frações acetato de etila e hexânica, que não diferem significativamente entre si e da fração acetato de etila das flores.

TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO (FLORES E FOLHAS)

<b>Amostra (0,2 mg/mL)</b>	<b>Atividade Antioxidante (%)</b>	<b>DP</b>
EE FLOR	23,97	0,20 e
EE FOL	37,77	0,55 b
FHEX FLOR	3,23	0,9 g
FHEX FOL	45,06	0,64 a
FDCM FLOR	17,94	0,29 f
FDCM FOL	32,27	0,87 c
FAE FLOR	46,02	0,47 a
FAE FOL	45,5	0,50 a
NAR	2,76	0,06 gh
NAR GLI	3,81	0,20 g
TRI	1,41	0,15 h
RUT	29,48	0,46 d
AA	100,00	4,60 i

Legenda: Os valores das médias e desvios padrões (DP) são de três repetições. As Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice antioxidante ( $p < 0,05$ , utilizando ANOVA e teste de Tukey). EE: extrato etanólico; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; AA: ácido ascórbico; RUT: rutina; FAER 20: substância isolada da fração acetato de etila remanescente; NARGLI: 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina isolada das flores e das folhas; NAR: naringenina isolada das flores e das folhas; TRI: 16,18 tritriacontanodiona isolada das flores e das folhas.

A Figura 37 apresenta a atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio, frente ao extrato etanólico, às frações diclorometano e acetato de etila das flores e os padrões de rutina e ácido ascórbico.



Legenda: EE (extrato etanólico), FDCM (fração diclorometano), FAE (fração acetato de etila), AA (ácido ascórbico), RUT (rutina)

FIGURA 37 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA OS PADRÕES (ÁCIDO ASCÓRBICO E RUTINA), EXTRATOS E FRAÇÕES (EE, FDCM E FAE) OBTIDOS DAS FLORES

#### 5.7.2 Ensaio com o radical livre DPPH

Nestes ensaios, o radical DPPH foi reduzido pelas substâncias com caráter antioxidante presentes nas amostras, havendo alteração da coloração violeta para amarela, proporcionalmente à concentração destes componentes nas amostras, verificado pela diminuição gradual das absorbâncias durante o tempo de reação.

### 5.7.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pela cromatografia em camada delgada

As amostras analisadas das flores e folhas, as substâncias isoladas e os padrões de rutina e ácido ascórbico alteraram a coloração púrpura do radical DPPH, reduzindo-o ao composto 2,2-difenil-1-picril hidrazina, de coloração amarela, conforme demonstram as Figuras 38 e 39, indicando a presença de substâncias de caráter antioxidante.



EE FDCM FAE RUT  
Fase móvel: AcEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O (90:5:5)

Legenda: EE (extrato etanólico), FDCM (fração diclorometano), FAE (fração acetato de etila), RUT (rutina), AcEt (acetato de etila), HCOOH (ácido fórmico), H<sub>2</sub>O (água)

FIGURA 38 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS (EE, FDCM E FAE) E DO PADRÃO (RUT), POR CCD NEBULIZADA COM DPPH (FLORES)





1; 2; 3; 4

Fase móvel: AcEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O (90:5:5)

Legenda: substâncias 1 (naringenina), 2 (5-β-D-glicosil naringenina), 3 (rutina), 4 (ácido ascórbico), AcEt (acetato de etila), HCOOH (ácido fórmico), H<sub>2</sub>O (água)

FIGURA 39 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS SUBSTÂNCIAS NAR E NARGLI E DOS PADRÕES DE RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO, POR CCD NEBULIZADA COM DPPH (FLORES)

#### 5.7.2.2 Avaliação da redução do radical DPPH por espectroscopia de UV-vis:

Na Tabela 18 estão representados os valores médios dos EC<sub>50</sub> de cada amostra avaliada, ou seja, as concentrações destas que são necessárias para capturar 50% do radical livre DPPH que lhes foi adicionado com conseqüente inibição da acumulação de produtos oxidados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. O padrão de ácido ascórbico apresentou atividade antioxidante significativamente maior que os demais avaliados (EC<sub>50</sub> = 0,49 ± 0,11 µg/mL).

As amostras obtidas das folhas demonstraram ser significativamente mais ativas que as flores, provavelmente devido à presença de outros compostos fenólicos que não estariam presentes nas flores, que estariam contribuindo neste processo. Com as folhas, a fração mais ativa foi a diclorometano (EC<sub>50</sub> = 2,81 ± 0,70 µg/mL), seguida pela fração acetato de etila (EC<sub>50</sub> = 5,48 ± 0,47) e pelo extrato etanólico (EC<sub>50</sub> = 5,91 ± 0,64)

que não diferem significativamente, apresentando atividade semelhante à demonstrada pela rutina ( $EC_{50} = 4,14 \pm 1,13$ ).

Para as flores, a fração acetato de etila ( $EC_{50} = 3,22 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$ ), ainda que menos ativa que o padrão de ácido ascórbico, apresentou a maior atividade comparada às outras amostras avaliadas das flores, não diferindo significativamente do padrão de rutina ( $EC_{50} = 4,14 \pm 1,13$ ) e da fração acetato de etila das folhas ( $EC_{50} = 5,48 \pm 0,47$ ).

TABELA 18 - ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH ( $EC_{50}$ ).

Amostra	$EC_{50}$	DP
RES	874,56	9,24a
NAR	857,26	10,88a
NARGLI	295,29	10,31c
FHEX FLOR	124,10	2,62d
FDCM FLOR	36,65	6,68e
FHEX FOLHA	26,79	1,16f
EE FLOR	10,49	2,56g
EE FOLHA	5,91	0,64h
FAE FOLHA	5,48	0,47hi
RUTINA	4,14	1,13hij
FAE FLOR	3,22	0,59ij
FCDM FOLHA	2,81	0,70j
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,49	0,11k

Legenda: Os valores das médias e desvios padrões (DP) são de três repetições. As Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no  $EC_{50}$  entre as diversas amostras ( $p < 0,05$ , utilizando ANOVA e teste de Tukey).  $EC_{50}$ : concentração necessárias para capturar 50% do radical livre DPPH adicionado; EE: extrato etanólico; FHEX: fração hexânica; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; NARGLI: 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina; NAR: naringenina; RES: 16, 18 tritriacontanodiona

As substâncias isoladas demonstraram atividade antioxidante muito menor que a apresentada pelas frações de origem (valores de  $EC_{50}$  elevados). Destas, a mais ativa foi a 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina ( $EC_{50} = 295,29 \pm 10,31$ ). Não houve diferenças

significativas entre a naringenina e a 16, 18 tritriacontanodiona ( $EC_{50} = 857,26 \pm 10,88$  e  $874,56 \pm 9,24 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

O baixo desempenho antioxidante das flavanonas naringenina livre e heterosídica, utilizando o radical livre DPPH, havia também sido verificado por EDENHARDER e GRÜNHAGE (2003). Estes autores relacionaram a estrutura química de flavonoides com o efeito antioxidante ocasionado que dependeria da presença de hidroxila livre no carbono 3 (anel C); de insaturação entre o carbono 2 e 3 (anel C); da presença do grupo carbonil (posição 4 do anel C); do padrão e número de hidroxilas nos anéis A, B e C e da presença de açúcares (EDENHARDER; GRÜNHAGE, 2003).

### 5.7.3 Avaliação de atividade antioxidante pelo teste TBARS:

Nos testes utilizando as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), ocorre a avaliação do ponto final da peroxidação lipídica, ao mensurar a substância malonildialdeído (MDA), que resulta neste processo, permitindo avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido e da proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes no material analisado (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005). Nestes testes a mensuração da peroxidação lipídica de matrizes biológicas é realizada pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA, em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, gerando um cromóforo rosado que pode ser medido espectrometricamente (MIYATA, SMITH, 1996; KELLER *et al.*, 2000; DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005).

As amostras avaliadas obtidas das folhas de *A. podalyriifolia* também demonstraram maior atividade antioxidante do que a apresentada pelas flores pelo teste TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico), expressa como índice antioxidante (IA) em porcentagem (Tabela 19).

TABELA 19 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO TESTE TBARS COMO  
ÍNDICE ANTIOXIDANTE (IA) EM PORCENTAGEM (%)

Concentração	1000 ppm			500 ppm			100 ppm		
Amostra	IA	DP		IA	sd		x	sd	
BHT	35,15	3,42	Ac	20,25	1,07	Bc	10,73	0,59	Cab
EE FOLHA	52,8	1,68	Aa	38,93	2,29	Ba	4,5	0,95	Ccde
EEFLOR	29,43	0,65	Acde	18,05	2,01	Bcd	13,07	1,91	Ca
FAE FLOR	24,84	1,28	Aef	16,45	1,73	Bcd	5,98	1,38	Ccde
FAE FOLHA	31,2	1,02	Acd	16,67	1,77	Bcd	8,57	0,95	Cbc
FDCM FLOR	19,75	2,31	Afg	7,6	1,42	Bf	4,55	1,6	Bcde
FDCM FOLHA	23,68	1,48	Aef	14,06	1,9	Bd	4,63	1,95	Ccde
FHEX FLOR	42,64	0,84	Ab	32,61	1,04	Bb	6,3	2,59	Ccd
FHEX FOLHA	41,31	2,91	Ab	13,41	1,16	Bde	6,09	1,66	Ccd
NAR	14,6	2,42	Ag	8,6	1,31	Bef	_____	_____	_____
NARGLI	27,74	2,5	Ade	14,19	2,02	Bd	1,63	1,55	Ce
AA	21,73	1,77	Af	14,87	1,44	Bd	3,67	0,7	Cde
RES	_____	_____	_____	17,76	1,01	Bcd	_____	_____	_____

Legenda: IA = Índice de atividade antioxidante expresso em porcentagem (%), referente à média de três repetições. DP (desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice de atividade (IA) entre as três concentrações da mesma amostra. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice da atividade (IA) entre as diversas amostras em relação à mesma concentração ( $p < 0,05$ , utilizando ANOVA e teste de Tukey). \_\_\_\_: sem atividade antioxidante. EE: extrato etanólico; FHEX: fração hexânica; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; AA: ácido ascórbico; BHT: butil hidróxi tolueno; NARGLI: 5-β-D-glicosil naringenina; NAR: naringenina; RES: 16,18 tritriacontanodiona.

Para as folhas, destaca-se o extrato etanólico ( $52,80 \% \pm 1,68$  e  $38,93 \pm 2,29$ ) que superou as atividades apresentadas pelos padrões de BHT ( $35,15 \pm 3,42$  e  $20,25 \pm 1,07$ ) e de ácido ascórbico ( $21,73 \pm 1,77$  e  $14,87 \pm 1,44$ ), respectivamente para 1000 e 500 ppm.

As frações hexânicas das flores e das folhas apresentaram elevados índices antioxidantes ( $42,64\% \pm 0,84$  e  $41,31 \pm 2,91$ , respectivamente), não diferindo significativamente entre si e consideravelmente superiores aos apresentados pelos padrões, nas concentrações de 1000 ppm.

A fração acetato de etila das folhas ( $31,20\% \pm 1,02$  e  $16,67 \pm 1,77$ ) apresentou atividade superior ao padrão de ácido ascórbico e semelhante a do padrão de BHT, nas concentrações de 1000 e 500 ppm, enquanto que o desempenho desta fração

obtida das flores foi semelhante ao do ácido ascórbico nas mesmas concentrações ( $24,84 \pm 1,28$  e  $16,45 \pm 1,73$ ).

Com a fração diclorometano, não houve diferenças significativas entre a obtida das flores ( $19,75 \pm 2,31$ ) e das folhas ( $23,68 \pm 1,48$ , sendo equivalentes à desenvolvida pelo padrão de ácido ascórbico, nas concentrações de 1000 ppm.

A ação antioxidante desempenhada pela 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina ( $27,74\% \pm 2,50$ ) foi superior a apresentada pelo ácido ascórbico em 1000 ppm e não diferiu significativamente deste padrão nas concentrações de 500 e 100 ppm ( $14,19 \pm 2,0$  e  $1,63\% \pm 1,55$ ). Já o desempenho da naringenina, ainda que também demonstrasse atividade, foi inferior aos padrões nas concentrações avaliadas. Estes resultados estão condizentes com os apresentados por LEE e colaboradores (2002; 2004), que já haviam também demonstrado ação antioxidante das flavanonas naringenina e seus derivados no decréscimo da peroxidação lipídica. Com a substância obtida do resíduo do extrato etanólico, a 16, 18 tritriacontanodiona, com 1000 e 100 ppm não foi verificado efeito antioxidante, por não ter sido bem assimilado nestas reações pela elevada concentração do primeiro e pela baixa concentração do segundo. No entanto, com 500 ppm foi verificado efeito antioxidante ( $17,76\% \pm 1,01$ ) que não diferiu significativamente do apresentado pela 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina e do ácido ascórbico nesta concentração.

Pelos testes antioxidantes aqui realizados, utilizando o complexo fosfomolibdênio, o radical livre DPPH e TBARS, os resultados obtidos foram diferentes, dependendo se o material era originário das flores ou das folhas da *A. podalyriifolia* e da metodologia antioxidante utilizada. Isto pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de reações envolvidos entre os compostos com características antioxidantes presentes nestes materiais e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidade por estes, conforme foi descrito por SÀNCHEZ-MORENO (2002) e VASCONCELOS *et al.*(2007).

Nos ensaios antioxidantes utilizando o radical DPPH e com o complexo fosfomolibdênio, a fração acetato de etila das flores foi a amostra mais ativa. No entanto, através destes testes as substâncias majoritárias obtidas desta fração, a 5- $\beta$ -

D-glicosil naringenina e a naringenina, demonstraram um baixo desempenho antioxidante. Pelo teste TBARS, esta naringenina glicosilada demonstrou ação similar ao padrão de ácido ascórbico. Isto também foi observado para a 16, 18 tritriacontanodiona, isolada do resíduo do extrato etanólico. Com a naringenina, a pequena atividade antioxidante foi também verificada nos resultados obtidos para as três técnicas empregadas.

A diferença verificada quando a flavanona encontrava-se na forma glicosilada e quando aglicona pode ser explicada pela presença do maior número de hidroxilas fenólicas, presença de hidroxilas nos carbonos 4 do anel B e 7 do anel A, pois a doação de hidrogênios para os radicais livres ocorre principalmente nestas posições, como demonstrou BARREIROS, DAVID e DAVID (2006).

Diferentemente, para as folhas, ainda que nas metodologias antioxidantes avaliadas as amostras tenham tido um desempenho antioxidante superior ao demonstrado pelas flores, dependendo do teste empregado, o resultado mais expressivo variava. Nos ensaios com o radical DPPH, a fração diclorometano foi a mais ativa; com o fosfomolibdênio foi a fração acetato de etila e pelo TBARS foi o extrato etanólico.

O efeito antioxidante observado com os extratos, frações e substâncias isoladas das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* foi também verificado em inúmeros trabalhos com outras espécies deste gênero. Extratos de *A. catechu* (PARK; BOO, 1991; NAIK *et al.*, 2003), *A. confusa* (CHANG *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005), *A. nilotica* (SALEEM *et al.*, 2001) e *A. pennata* (THALANG *et al.*, 2001) apresentavam considerável ação antioxidante devido à presença de substâncias polifenólicas, como flavonoides e taninos nestes materiais. O mel obtido de *A. ehrenbergina* (AL-MAMARY *et al.*, 2002) e de outras espécies de *Acacia* (MEDA *et al.*, 2005), apresentou elevados potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos. Extratos e compostos flavonoídicos obtidos de *A. mangium* e *A. auriculiformis* demonstraram intensa atividade sequestradora de radicais livres (MIHARA *et al.*, 2005). Extratos de *Acacia salicina* apresentaram altos conteúdos de compostos flavonoídicos, que estariam relacionados com as atividades avaliadas (CHATTI *et al.*, 2009).

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonoides e ácidos fenólicos, apresentam destaque especial como eficientes removedores de radicais peroxila, além de reduzir e quelar íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (AL-MAMARY *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2003; RAMIREZ-MARES; MEJIA, 2003).

Com relação à  $\beta$ -dicetona 16, 18 tritriacontanodiona, ainda que tenha demonstrado baixa ação antioxidante *in vitro*, esta substância deve desempenhar outras funções importantes para a planta, o que poderia explicar a grande quantidade desta substância na *Acacia podalyriifolia*.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE GERAL:

Ainda que o bioensaio de toxicidade geral não seja específico para a avaliação de atividade antitumoral, um significativo número de espécies com toxicidade frente à *Artemia salina* apresentou maiores chances de também demonstrar ações citotóxicas e antitumorais. Isto se deve ao fato de que a maioria dos princípios ativos das plantas, que tem se evidenciado como tóxicos em elevadas doses, também apresentaram outras atividades farmacológicas, sendo com este teste possível monitorar o fracionamento destes extratos, exigindo menores gastos com recursos financeiros e de tempo que os testes de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Nestes testes, são consideradas ativas (citotóxicas) as amostras que apresentarem  $DL_{50}$  inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 20). Das amostras submetidas aos ensaios com a *Artemia salina*, a fração diclorometano das flores ( $DL_{50}=8,43 \pm 1,29$   $\mu\text{g/mL}$ ) foi a mais citotóxica, superando o controle positivo (dicromato de potássio,  $DL_{50} = 501,83 \pm 7,60$   $\mu\text{g/mL}$ ). As frações acetato de etila obtidas das flores ( $DL_{50} = 527,73 \pm 2,36$ ) e das folhas ( $DL_{50} = 446,59 \pm 29,13$ ) e a hexânica das flores ( $DL_{50} = 579,22 \pm 20,70$ ) demonstraram toxicidade geral não muito diferente da apresentada pelo controle positivo. No entanto, as substâncias majoritárias isoladas destas frações (5- $\beta$ -D-glicosil naringenina, naringenina e 16, 18 tritriacontanodiona), não se apresentaram ativas ( $DL_{50}$  maior do que 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Isto pode ser devido presença de outros compostos nestas frações que poderiam estar influenciando nos resultados, ou por um sinergismo entre estes, conforme demonstrado por CHATTI *et al.*(2009).

TABELA 21– TOXICIDADE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FLORES E FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia*, FRENTE À *Artemia salina*

Amostra	DL <sub>50</sub>	DP
EE FLOR	673,55	12,48 a
EE FOL	637,22	34,53 ab
FHEX FLOR	579,22	20,70 bc
FHEX FOL	>1000	-----
FDCM FLOR	8,43	1,29 e
FDCM FOL	>1000	-----
FAE FLOR	527,73	2,36 c
FAE FOL	446,59	29,13 d
DICROMATO	501,83	7,60 f
NAR	>1000	-----
NAR GLI	>1000	-----
RES	>1000	-----

Legenda: Os valores das médias e desvios padrões (DP) são de três repetições. As Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas na DL<sub>50</sub> entre as diversas amostras ( $p < 0,05$ , utilizando ANOVA e teste de Tukey). DL<sub>50</sub> (concentração em µg/mL que causa 50% de mortalidade dos náuplios de *Artemia salina*; inativo quando DL<sub>50</sub> for maior que 1000 µg/mL). EE: extrato etanólico; FHEX: fração hexânica; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; NARGLI: 5-β-D-glicosil naringenina; NAR: naringenina; RES: 16,18 tritriacontanodiona.

Diante destes resultados, os extratos e frações com resultados positivos para a toxicidade geral, principalmente a fração diclorometano das flores, poderiam ser utilizados em pesquisas futuras de citotoxicidade, enquanto que aqueles materiais que não se demonstraram ativos nestes ensaios poderiam ser submetidos a outros testes de toxicidade para confirmar a ausência de efeitos tóxicos nestas dosagens.

### 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Este ensaio objetivou a verificação da interferência do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila, obtidos das flores e das folhas, e das substâncias isoladas, nas concentrações de 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 mg/mL, na



germinação e no crescimento das sementes de *Lactuca sativa* (alface) variedade Babá.

#### 5.9.1 Teste de germinação:

Houve predominância de germinação entre 24 e 48 horas de incubação tanto com as sementes submetidas aos analitos (extratos, frações e substâncias isoladas) como com o controle, sem alterações neste processo.

#### 5.9.2 Teste do crescimento:

Os resultados obtidos para o controle (água) foram apresentados nos gráficos em 100%. Os valores obtidos para as amostras foram relacionados a estes controles, permitindo a obtenção do crescimento radicular e caulicular (hipocótilo) em porcentagem.

Os referidos dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para se detectar diferenças entre as amostras e avaliar estas diferenças ( $p < 0,05$ ).

A Figura 40 apresenta a caixa Gerbox com o controle, no 6º dia de germinação, contendo as plântulas que se desenvolveram a partir das 20 sementes de *Lactuca sativa*.

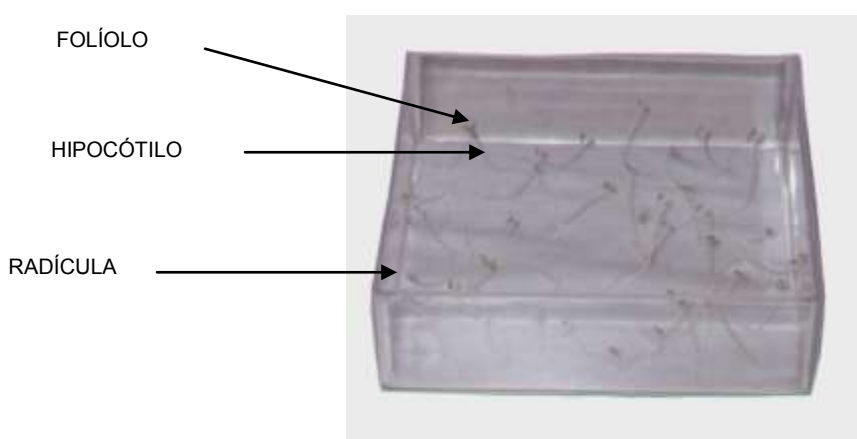


FIGURA 40 – CAIXAS GERBOX CONTENDO AS 20 SEMENTES DE *Lactuca sativa*, NO 6º DIA DE GERMINAÇÃO (CONTROLE).

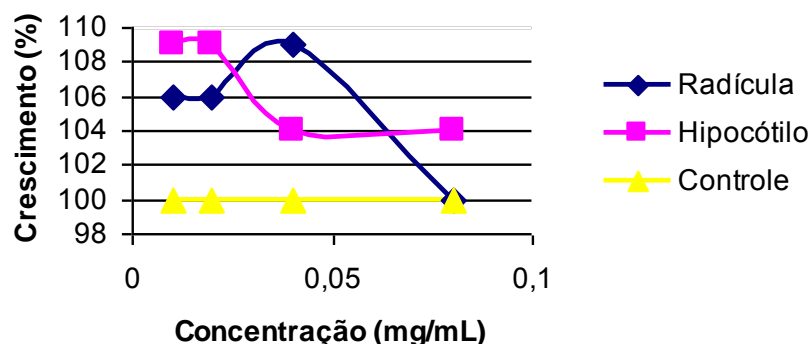


FIGURA 41 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

O pequeno estímulo no crescimento da radícula e do hipocótilo verificado com o extrato etanólico das flores (Figura 41) não foi considerado estatisticamente significativo.

Enquanto que para o extrato etanólico das flores os resultados obtidos não foram significativos, quando este foi obtido das folhas, houve intensa inibição radicular e estímulo caulicular (Figura 42). Este desequilíbrio entre o crescimento caulicular e radicular pode impossibilitar o desenvolvimento ao gerar plântulas anormais (FERREIRA; AQUILA, 2000). Com o aumento da concentração foi acentuada a redução no crescimento radicular, destacando-se as concentrações de 0,04 mg/mL (22% de inibição) e 0,08 mg/mL (16% de inibição), resultados estatisticamente relevantes em relação ao controle e que não diferiram significativamente entre si. Para o hipocótilo (caulículo), houve estímulo do crescimento nas várias concentrações avaliadas, sendo significativos os efeitos apresentados pelas concentrações de 0,04 mg/mL (23% de estímulo) e de 0,01 mg/mL (24%) que não diferem entre si.

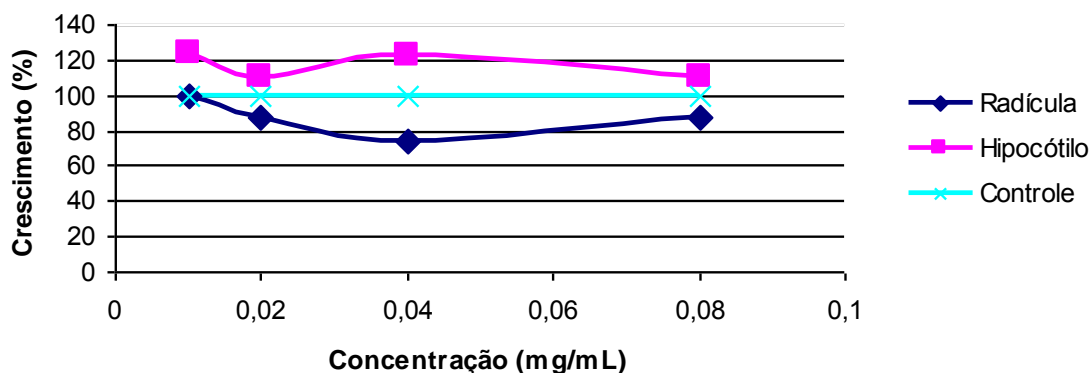


FIGURA 42 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

Para a fração hexânica das flores, o estímulo do crescimento radicular observado não foi significativo. No crescimento do hipocótilo, houve inibição, apresentando relevância estatística os resultados demonstrados pelas concentrações de 0,08 mg/mL e 0,02 mg/mL (11 e 19% de inibição, respectivamente) que não diferem significativamente entre si (Figura 43).

Para a fração hexânica das folhas, foi significativa a inibição do crescimento radicular (17%) observada com 0,08 mg/mL desta fração. Para o hipocótilo, não foram obtidas diferenças significativas em relação ao controle (água) (Figura 44).

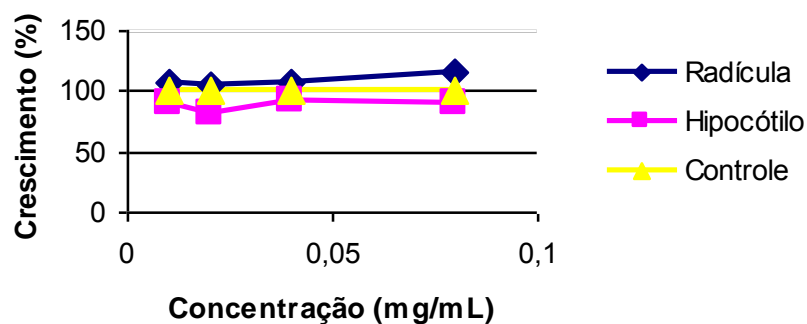


FIGURA 43 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO HEXÂNICA OBTIDA DAS FLORES DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

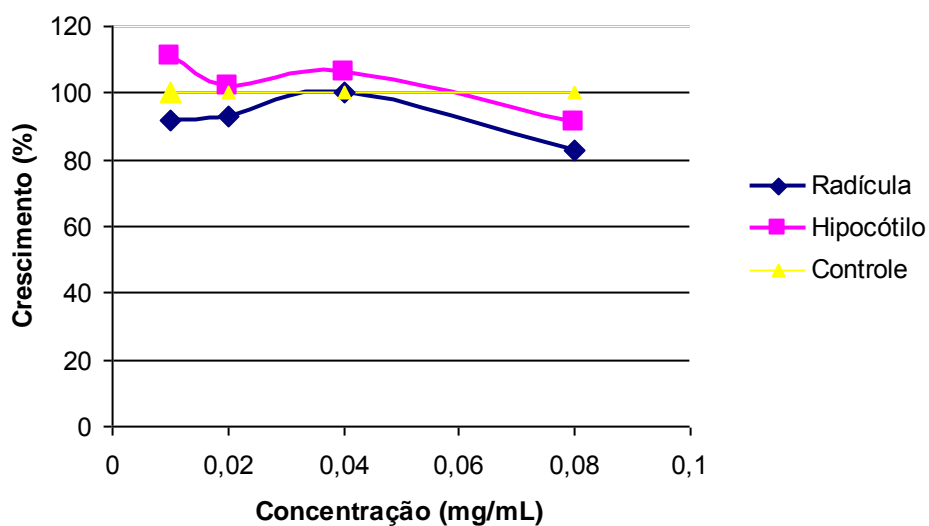


FIGURA 44 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO HEXÂNICA OBTIDA DAS FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

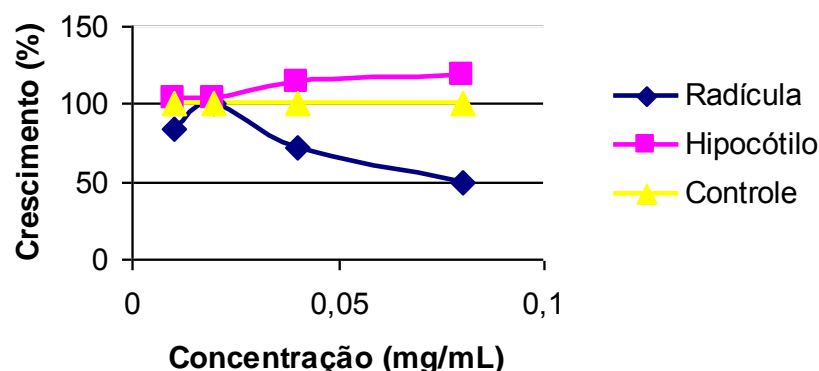


FIGURA 45 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS FLORES DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

Para a fração diclorometano das flores (Figura 45), houve considerável efeito alelopático, apresentando inibição do crescimento radicular e estímulo caulicular. Com 0,08 mg/mL houve 50% de inibição no crescimento da radícula (necrose radicular) e 18% de estímulo ao crescimento caulicular. Com as demais concentrações, os resultados não foram significativos em relação ao controle, indicando possivelmente que nestas concentrações haja um equilíbrio entre as substâncias indutoras e inibidoras do crescimento. Com 0,08 mg/mL da fração diclorometano pode-se observar que houve influências significativas no ciclo de desenvolvimento da radícula, inviabilizando o crescimento da plântula ao gerar exemplares anômalos pelas discrepâncias verificadas no crescimento radicular e caulicular.

Ainda, com a fração diclorometano das flores, associado aos efeitos observados no crescimento radicular e caulicular (hipocótilo), houve ausência de folíolos nas sementes desenvolvidas neste substrato, salientando a caracterização de efetivo potencial alelopático desta fração.

No entanto, para a fração diclorometano obtida das folhas, os resultados obtidos para o crescimento da radícula e do hipocótilo não foram significativos nas concentrações avaliadas (Figura 46).

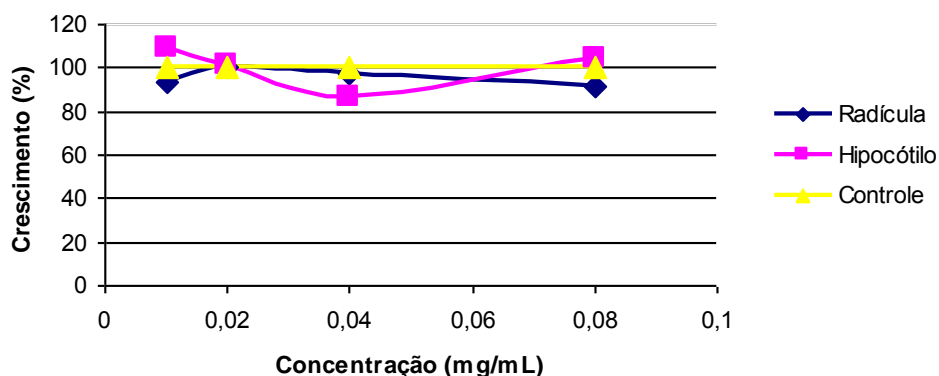


FIGURA 46 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

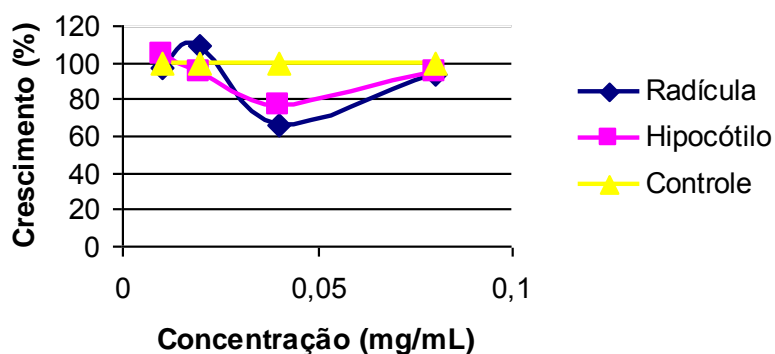


FIGURA 47 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

Na Figura 47 observa-se que houve significativa resposta biológica com 0,04 mg/mL da fração acetato de etila das flores, apresentando inibição do crescimento da radícula (34%) e do hipocótilo (23%). Para as demais concentrações não houve

alteração significativa em relação ao controle. No entanto, não houve desenvolvimento de folíolos com as plântulas que cresceram neste substrato, reforçando o potencial alelopático desta fração.

Para a fração acetato de etila das folhas, o estímulo radicular e caulicular observado não foi significativo entre as concentrações avaliadas e entre estas e o controle (Figura 48).

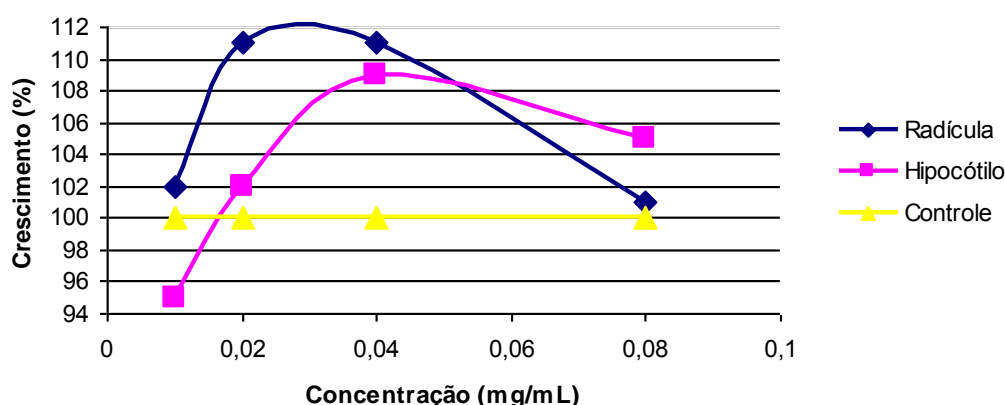


FIGURA 48 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Acacia podalyriifolia*, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

As substâncias isoladas naringenina, 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina e 16, 18 tritriacontanodiona apresentaram efeitos significativos no crescimento da plântula, contribuindo na atividade alelopática verificada com as suas frações de origem.

Para a substância 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina, obtida das frações diclorometano e acetato de etila houve considerável efeito alelopático, com inibição do crescimento radicular e caulicular, demonstrando importante contribuição desta substância na atividade demonstrada por estas frações obtidas das flores. Ainda que tenha também sido obtida da fração acetato de etila das folhas, por apresentar-se em uma concentração inferior à demonstrada pelas flores, não foi suficiente para promover uma alteração significativa.

Os resultados obtidos para a 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina foram significativamente diferentes entre as amostras e entre estas e o controle (Figura 49). Para a radícula, a inibição do crescimento observada foi mais acentuada à medida que reduzia a concentração das amostras, sendo que com 0,01 mg/mL a inibição do crescimento foi de 33% quando comparada ao controle. Com concentrações menores, é provável que este aleloquímico seja melhor absorvido pela semente, uma vez que é apenas parcialmente solúvel em água. Para o hipocótilo, em todas as concentrações avaliadas, sem haver diferenças significativas entre estas, houve inibição estatisticamente relevante do crescimento, quando comparado ao controle, apresentando resultados entre 24 e 38% de inibição. Também não houve desenvolvimento de folíolos nestas plântulas o que impediria o desenvolvimento deste vegetal.

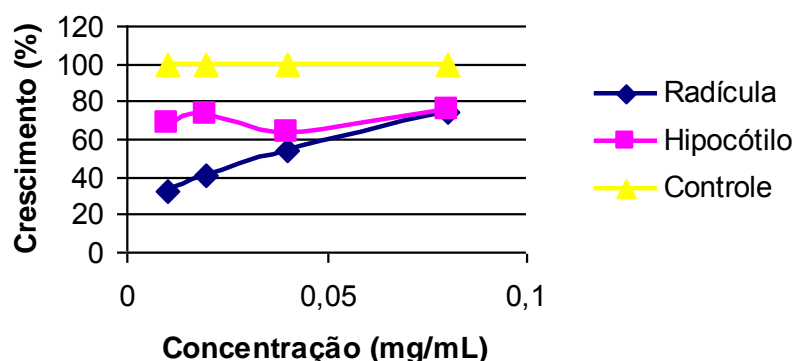


FIGURA 49 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À 5- $\beta$ -D-GLICOSIL NARINGENINA, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

A substância naringenina, obtida também das frações diclorometano e acetato de etila, demonstrou efeitos alelopáticos no crescimento das plântulas avaliadas, contribuindo na atividade observada nestas frações a partir das flores. Comparando-os ao controle, houve estímulo no crescimento da radícula (18%) que foi significativamente observado com 0,04 mg/mL desta substância. A inibição do crescimento do hipocótilo observada com esta substância foi significativa para todas as concentrações avaliadas, com destaque para 0,02 mg/mL (27% de inibição), seguida



pelas demais concentrações que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si (inibição de 12 a 16%) (Figura 50).

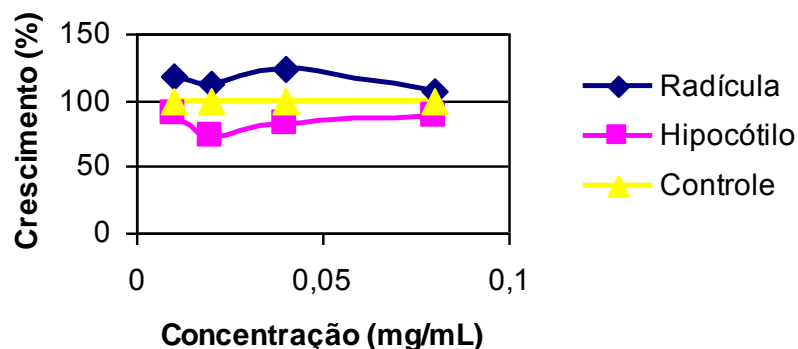


FIGURA 50 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À SUBSTÂNCIA OBTIDA NARINGENINA, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

Com a substância 16, 18 tritriacontanodiona, obtida do resíduo do extrato etanólico e da fração hexânica, houve inibição expressiva em 21% do crescimento radicular e sem alteração significativa do hipocótilo, com a concentração de 0,01 mg/mL. Com as demais concentrações as alterações foram discretas (Figura 51). A intensa inibição ocorrida por esta substância na menor concentração empregada nos ensaios pode ser devido ao forte caráter apolar desta, possibilitando que seja mais facilmente absorvida quando em concentrações mais baixas.

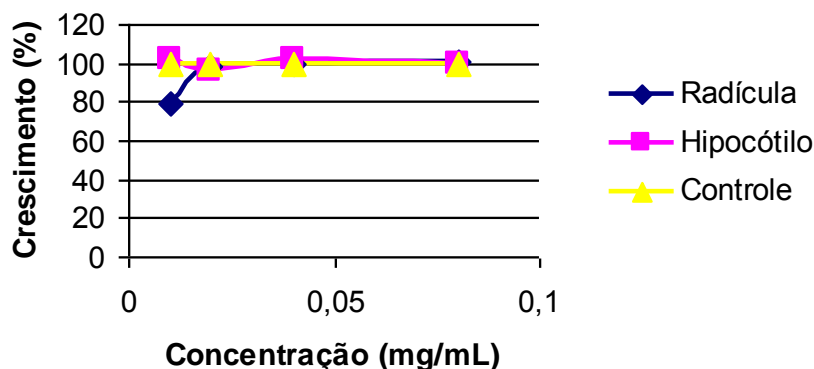


FIGURA 51 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* FRENTE À 16, 18 TRITRIACONTANODIONA, COMPARADA AO CONTROLE (100%).

Sobre os efeitos alelopáticos observados nas sementes de *Lactuca sativa*, variedade Babá, perante às amostras obtidas das flores e das folhas, pode-se, resumidamente, afirmar que, embora não tenham afetado a germinação desta plântula, ocasionaram significativas influências no seu crescimento, quando comparados ao controle.

Os resultados diferenciados obtidos quando os extratos ou frações eram procedentes das flores ou das folhas devem-se possivelmente à presença de substâncias diversas nestes, pertencentes aos grupos que foram detectados na triagem fitoquímica.

Plântulas anormais, com necrose da radícula, foram observadas nos ensaios com as frações acetato de etila e diclorometano das flores, com o extrato etanólico e a fração diclorometano das folhas, bem como com as substâncias isoladas 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina e 16, 18 tritriacontanodiona. Estes dados sugerem a presença de aleloquímicos nestas amostras, pois conforme afirmam FERREIRA e AQUILA (2000), a presença de substâncias alelopáticas pode induzir este efeito.

Aliado a isto, observou-se discrepâncias no crescimento da radícula e do hipocótilo que também poderiam conduzir a obtenção de plântulas anormais as quais

provavelmente não conseguiriam completar o seu ciclo de desenvolvimento, como ocorreu com a naringenina.

Ainda, a inibição do crescimento radicular pode ocasionar a diminuição de absorção de nutrientes pela raiz, acarretando problemas para o desenvolvimento e a sobrevivência da plântula. Concomitantemente, a ausência de desenvolvimento de folíolos nas plântulas que cresceram nos substratos avaliados, reforça o potencial alelopático das frações em estudo.

A atividade biológica testada com o extrato etanólico das flores foi discreta em relação ao efeito observado com as demais amostras, possivelmente devido a grande diluição de seus componentes antes do fracionamento. Contudo, o leve estímulo do crescimento verificado com o extrato etanólico das flores representa um atributo complementar referente à concentração diferenciada dos aleloquímicos presentes na referida fração. Comportamento semelhante também foi observado com a fração hexânica.

Os resultados obtidos nos testes do crescimento sugerem a presença de aleloquímicos nas flores e folhas de *Acacia podalyriifolia*, conforme já havia sido observado com diversas espécies pertencentes a este gênero. Para as flores, houve efeito alelopático significativo para 0,04 mg/mL da fração acetato de etila, para 0,08 mg/mL da fração diclorometano e para a substância isolada 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina nas concentrações avaliadas, evidenciando-se elevada atividade biológica, possivelmente devido a presença de compostos fenólicos, tanoides e flavonoides nas frações, detectados na triagem fitoquímica e confirmados com o isolamento desta substância nestas frações. Este efeito caracterizado para substâncias fenólicas e flavonoídicas foram evidenciados também nos extratos de *Acacia melanoxylon* (GONZÁLES *et al.*, 1995), de *Acacia confusa* (CHOU *et al.*, 1998) e de *Acacia nilotica* (SWAMINATHAN *et al.*, 1989).

## 6. CONCLUSÃO

Referenciando aos objetivos inicialmente propostos que visavam o estudo da composição química majoritária das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, com ênfase nas substâncias fenólicas, bem como a avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante, citotoxicidade geral e alelopática, algumas considerações puderam ser feitas.

Em aspectos gerais, o extrato etanólico, seu resíduo e suas frações, obtidos das flores, apresentaram um maior rendimento (42,60% p/p em relação às flores secas) do que quando obtido das folhas (27,02% p/p em relação às folhas secas). Para as flores, o maior rendimento entre as frações foi da fração acetato de etila (4,21%), enquanto que para as folhas foi a hexânica (8,93%) que até superou o resíduo (8,13%).

A triagem fitoquímica também mostrou diferenças quando os extratos ou frações eram originários das flores ou das folhas. Para as flores, detectou flavonoides, taninos, compostos fenólicos e esteroides/triterpenoides, enquanto que no material obtido das folhas foi verificada a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, quinonas e esteroides/triterpenoides.

Na determinação do conteúdo de compostos fenólicos, as flores demonstraram os maiores resultados, com destaque para a fração acetato de etila ( $33,85 \pm 1,52$  mg% de ácido gálico). Ainda que consideravelmente menor que nas flores, para as folhas a fração acetato de etila também apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos ( $22,9 \pm 1,57$  mg% de ácido gálico). Os elevados teores de compostos fenólicos nestes materiais estão em conformidade com os relatos em literatura como sendo o gênero *Acacia* uma fonte importante destas substâncias. Como os compostos fenólicos participam de inúmeras atividades, dentre as quais a antibacteriana, antioxidante, citotóxica e alelopática, aqui avaliadas, pode-se também considerá-los promissores em estudos posteriores de outros ensaios biológicos.

A partir das flores, como substâncias majoritárias fenólicas isoladas e identificadas, foram obtidas as flavanonas 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina e sua aglicona naringenina, correspondendo a 4,46 e 0,80 mg/g de flor, respectivamente, obtidas das frações diclorometano e acetato de etila, ainda não obtidas de *Acacia podalyriifolia*. Foi também isolada a  $\beta$ -dicetona 16, 18 tritriacontanodiona, correspondendo a 18,36 mg/g

de flor, obtida da fração hexânica e do resíduo. Das folhas, foram também isoladas a 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina, correspondendo a 2,11 mg/g de folha, obtida da fração acetato de etila e a 16, 18 tritriacontanodiona, correspondendo a 5,79 mg/g de folha, obtida da fração hexânica e do resíduo.

Os extratos e frações das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia*, ainda que tenham se demonstrado ativos nos testes biológicos avaliados, apresentaram resultados diferenciados quando eram procedentes das flores ou das folhas, pela presença de substâncias diversas nestes, pertencentes aos grupos que foram detectados na triagem fitoquímica, e que estariam contribuindo nas atividades avaliadas, bem como à possibilidade de sinergismo entre estes. As substâncias fenólicas isoladas (naringenina e 5- $\beta$ -D- glicosil naringenina) demonstraram atividade antibacteriana, antioxidante e alelopática, contribuindo nos resultados que foram obtidos nestas avaliações com as suas frações de origem. Entretanto, a presença da 16, 18 tritriacontanodiona pode estar colaborando nos resultados dos testes de alelopatia, por não ter apresentado atividade nos outros testes avaliados. Nenhuma destas substâncias isoladas apresentou-se como citotóxica por estes ensaios.

As análises da atividade antibacteriana, realizadas pelas metodologias de bioautografia, difusão em disco e concentração inibitória mínima confirmaram ser a fração acetato de etila, obtida tanto das flores como das folhas, a mais ativa inibindo várias das cepas gram positivas e gram negativas avaliadas, em graus variáveis. Para as substâncias isoladas, nas concentrações utilizadas, apenas a naringenina aglicona inibiu o crescimento bacteriano de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, apresentando concentração inibitória mínima de 2 mg/mL. O efeito antibacteriano detectado nestes materiais justifica a realização de estudos futuros, diante de outras cepas patogênicas, ou aplicando-os em técnicas diversas, para um possível emprego industrial com segurança e eficácia.

As flores e as folhas de *Acacia podalyriifolia* apresentaram significativa ação antioxidante, correspondendo a uma importante fonte de substâncias com esta característica. Para a atividade antioxidante, realizada pelas metodologias que empregavam o radical livre 2,2-difenil, 1-picrilhidrazil (DPPH), formação do complexo fosfomolibdênio e o teste TBARS, destaque especial também apresentou a fração acetato de etila, inclusive superando o padrão empregado nestes testes, ainda que os

resultados fossem diferentes conforme a técnica utilizada. Em geral, os extratos e frações obtidas das folhas apresentaram maior ação antioxidante do que as flores, pela provável presença de outros compostos fenólicos e flavonoides nestes materiais. As substâncias isoladas 5- $\beta$ -D-glicosil-naringenina, naringenina e 16, 18 tritriacontanodiona (respectivamente, em ordem decrescente de atividade), que se apresentaram pouco ativas nos testes com o complexo fosfomolibdênio e com o radical DPPH, demonstraram maior ação antioxidante pelo teste TBARS, inclusive superando os padrões utilizados. Isto pode ser devido aos diferentes mecanismos de reações envolvidos nestes ensaios.

Das amostras submetidas aos ensaios com a *Artemia salina*, a fração diclorometano das flores ( $DL_{50}=8,43 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$ ) foi a mais citotóxica, superando o controle positivo (dicromato de potássio,  $DL_{50} = 501,83 \pm 7,60 \mu\text{g/mL}$ ). As frações acetato de etila obtidas das flores e das folhas e a hexânica das flores demonstraram toxicidade geral não muito diferente da apresentada pelo controle positivo. No entanto, as substâncias majoritárias isoladas destas frações (5- $\beta$ -D-glicosil naringenina, naringenina e 16, 18 tritriacontanodiona, não se apresentaram ativas ( $DL_{50}$  maior do que  $1000 \mu\text{g/mL}$ ). Sendo assim, os extratos e frações com resultados positivos para a toxicidade geral, principalmente a fração diclorometano das flores, poderiam ser utilizados em pesquisas futuras de citotoxicidade, enquanto que aqueles materiais que não se demonstraram ativos nestes ensaios poderiam ser submetidos a outros testes de toxicidade para confirmar a ausência de efeitos tóxicos nestas dosagens, para permitir o seu uso futuro de maneira segura.

Sobre o potencial alelopático observado sobre as sementes de *Lactuca sativa*, variedade Babá, perante às amostras obtidas das flores e das folhas, embora não tenham afetado a germinação desta plântula, ocasionaram significativas influências no seu crescimento, quando comparadas ao controle. Os efeitos alelopáticos demonstrados no crescimento de *L. sativa* foram significativamente superiores com as frações obtidas das flores do que quando obtida das folhas. Destacam-se as frações diclorometano e acetato de etila obtidas das flores, que demonstraram intensa inibição do crescimento radicular e estímulo caulicular, inviabilizando o crescimento da plântula ao gerar exemplares anômalos pelas discrepâncias verificadas no crescimento radicular e caulicular. As substâncias isoladas naringenina, 5- $\beta$ -D-glicosil naringenina e

16, 18 tritriacontanodiona apresentaram efeitos significativos no crescimento da plântula, contribuindo na atividade alelopática verificada com as suas frações de origem. Estes resultados permitem a utilização destes produtos em outros ensaios sobre a inibição ou o estímulo do crescimento vegetal, avaliando o seu impacto sobre outras espécies vegetais, para que possa ser empregado como uma alternativa ao uso de agrotóxicos, principalmente para o cultivo de plantas medicinais.

Considerando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos. Destacam-se ainda, os resultados promissores obtidos nas avaliações biológicas aqui analisadas, aliados à considerável quantidade das substâncias isoladas, tanto nas flores quanto nas folhas desta planta e à ausência de toxicidade geral destas, verificada neste teste preliminar, justificam a realização de outros ensaios futuros com estas amostras, evidenciando as múltiplas possibilidades de aplicação, sendo a *Acacia podalyriifolia* considerada uma importante fonte destas substâncias.

## REFERÊNCIAS

- ACKER, F.V. Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. **Febs Letters**, v. 473, p. 145-148, 2000.
- ADEDAPO, A.; SOFIDIYA, M. O.; MASIKA, P. J.; AFOLAYAN, A. J. Anti-inflammatory and analgesic activities of aqueous extract of *Acacia karro* stem bark in experimental animals. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 103, n. 5, p. 397-400, 2008.
- AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.
- AGUNU, A.; YUSUF, S.; ANDREW, G. O.; ZEZI, A. U.; ABDURAHMAN, E. M. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhea treatment in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 27-30, 2005.
- AHMAD, M. M.; MOIN-UD-DIN-SHAIK, M. Improvement in glucose tolerance by *Carallum tuberculata*, *Acacia nilotica* and *Papaver somniferum*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 21, p. 325-332, 1989.
- AHMAD; I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 183-193, 1998.
- AHMED, K. H.; KHATTAB, A. M.; EL-KHRISY, E. A. M.; ABDEL-HAMID, A. Z. Constituents and molluscicidal activity of *Acacia saligna*, *Chrysanthemum parthenium*. **Bulletin of the National Research Centre Cairo**, v. 24, n.1, p. 13-25, 1999.
- AHMED, S.; ANSARI, S. H.; PORCHEZHIAN, E. Antifungal activity of alcoholic extracts of *Ziziphus vulgaris* and *Acacia concinna*. **Handard-Medicus**, v. 45, n. 2, p. 14-15, 2002.
- AKHTAR, M. A.; RABHER-BHATTI, M. H.; ASLAM, M. Antibacterial activity of plant diffused against *Xanthomonas campestris* p.v. citri. **International Journal of Pest Management**, v. 43, n. 2, p. 149-153, 1997.
- AKKARI, H.; BEN SALEM, H.; GHARBI, M.; ABIDI, S.; DARGHOUTH, M. A. Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. **Animal Feed Science & Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 182-192, 2008.



- ALASBAHI, R. H.; SAFIYEVA, S.; CRAKER, L. E. Antimicrobial activity of some Yemeni medicinal plants. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 6, n. 3, p. 75-83, 1999.
- ALEXANDER, R.; CROFT, K. D.; KAGI, R. I.; SHEA, S. Saponins of *Acacia pulchella*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2741-2744, 1978.
- AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; SCHRÖDER, G.; LINDEQUIST, V. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.
- ALI, M. A.; MIKAGE, M.; KIUCHI, F.; TSUDA, Y.; KONDO, K. Screening of crude drugs used in Bangladesh for nematocidal activity on the larva of *Toxocaracanis*. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 45, p. 206-214, 1991.
- ALI, M. S.; AZHAR, I.; AHMAD, F.; AHMAD, V. U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of Mimosaceous plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 1, p. 43-46, 2001.
- ALI, S. L.; PATRA, R. C.; DIWIVEDI, S. K. Therapeutic efficacy of Becknor in clinical cases of diarrhoea in young calves. **Pashudhan**, v. 6, n. 4, p. 4-5, 2001.
- ALMAGBOUL, A. Z.; FAROUK, A.; BASHIR, A. K.; SALIH, A. K. M. Antibacterial activity of Sudanese plants used in folkloric medicine III. **Fitoterapia**, v. 56, p. 195-200, 1985.
- ALMAGBOUL, A. Z.; BASHIR, A. K.; KARIM, A.; SALIH, M. Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine: screening for antibacterial activity (V). **Fitoterapia**, v. 59, n. 1, p. 57-62, 1988.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ALMAS, K. Antimicrobial effects of seven different types of Asian chewing sticks. **Odontostomatology Tropical**, v. 24, n. 96, p. 17-20, 2001.
- ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, F. **Pharmacology**, v. 157, n. 8, p. 1410-1418, 2009.
- ALY, S. A.; ALY, H. F.; SABA EL RIGAL; N. SAMMOUR, E.M. Induced changes in biochemical parameters of the molluscan tissues non-infected using two potent plants molluscicides. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 527-542, 2004.

- ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- AMOS, S.; AKAH, P. A.; ODUKWE, C. J.; GAMANIEL, K. S.; WAMBEBE, C. The pharmacological effects of an aqueous extract from *Acacia nilotica* seeds. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 8, p. 683-685, 1999.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C. Studies of uronic acid materials: Part 49. Partial structural studies of four *Acacia* gums exudates of the series Phyllodineae. **Phytochemistry**, v. 15, n. 2, p. 301-303, 1976.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.
- ANDRADE, C. A. **Flores de *Acacia podalyriaefolia* A. Cunn. (Leguminosae-Mimosoideae): avaliação fitoquímica e das atividades antibacteriana e alelopática.** Curitiba, 2003 a. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- ANDRADE, C. A.; SILVA, V. C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* – atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**, v.4, n.1, p. 47-56, 2003 b.
- ANDRADE, C. A.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; FERRONATO, M. L.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIN, L.; KERBER, V. A. Efeitos alelopáticos das flores da *Acacia podalyriaefolia* A. Cunn. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 93-98, 2003 c.
- ANDRADE, C. A.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; CARVALHO, J. L. S.; ABRAHAO, W. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 13-15, 2005.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 231-235, 2007.

- ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAPEORGIU, V. P. Biological Activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. **Phytotherapy Research**, v. 71, n. 5, p. 501-507, 2003.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PTASALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- ANURAG, S.; SHARMA, A. K.; SAXENA, A. Allelopathic potential of *Acacia tortilis* in agroforestry systems of arid regions. **Allelopathic Journal**, v. 3, n. 1, p. 81-84, 1996.
- ARIAS, M. E.; GOMEZ, J. D.; CUDMANI, N. M.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. Ex Hook et Arn. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 191-2002, 2004.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox-Report**, v. 5, n. 6, p. 365-370, 2000.
- ATIQUE, A.; IQBAL, M. Traditional single drug treatment for psychosomatic dermal diseases. Glimpses in Plant Research Medicinal Plants. **New Vistas Research**, v. 11, p. 155-157, 1993.
- ATIQUE, A.; SIDDIQUE, M. G. Ethnopharmacological evaluation of bark drug of *Acacia leucophloea* Willd, **Journal of National Integrated Medical Association**, v. 31, p. 15-16, 1998.
- AYOUB, S. M. H. Polyphenolics molluscicides from *Acacia nilotica*. **Planta Medica**, v. 50, p. 532, 1984.
- AYOUB, S. M. H. Flavanol molluscicides from Sudan *Acacia*. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 23, n. 2, p. 87-90, 1985.
- \_\_\_\_\_. On the moluscicidal activity of the plant phenolics. **Fitoterapia**, v. 56, n. 4, p. 225-226, 1985.
- AYOUB, S. M. H.; YANKOV, L. Molluscicidal properties of the Sudan *Acacia*. **Fitoterapia**, v. 58, n. 5, p. 363-366, 1987.
- BABBAR, O. P.; JOSHI, M. N.; CHOWDHURY, B. L. Protection induced in chick embryos against Ranikhet disease virus by some plant extract or their fractions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 21, p. 637-638, 1983.

- BABU, S. P. S.; DEBAPRIYA, S.; GHOSH, N. K.; ARPITA, S.; SUKUL, N. C.; SHELLEY, B. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 451-454, 1997.
- BABU, S.; SEETHARAMAN, K.; NANDAKUMAR, R.; JOHNSON, I. Fungitoxic properties of some plant extracts against *Alternaria solani*, the tomato leaf blight pathogen. **Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring**, v. 10, n. 2, p. 157-159, 2000.
- BAGCHI, G. D.; AMRITA, S.; KHANUJA, S. P. S.; BANSAL, R. P.; SINGH, S. C.; SUSHIL, K. Wide spectrum antibacterial and antifungal activities in the seeds of some coprophilus plants of north Indian plains. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 69-77, 1998.
- BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; BHANUPRAKASH, V.; PATRA, R. C.; SWAMP, D.; KUMAR, M.; YADAV, M. P.; SINGH, R. K. Potential effect of *Acacia arabica* on peste des petits ruminants virus replication. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 3, p. 171-179, 2008.
- BALANDRIN, M. F. *et al.* Reverse-phase High-Pressure Liquid Chromatography of some tryptamine derivatives. **Journal of Chromatography**, v. 157, p. 365-370, 1978.
- BALI, H. S.; SINGH, S.; PATI, S. C. Preliminary screening of some plants for molluscicidal activity against two snail species. **Indian Journal Animal Science**, v. 55, p. 338-340, 1985.
- BANERJI, R.; SRIVASTAVA, A. K.; MISRA, G.; NIGAM, S. K.; SINGH, S.; NIGAM, S. C.; SAXENA, R. C. Steroid and triterpenoid saponins as spermicidal agents. **Indian Drugs**, v. 17, n. 1; p. 6-8, 1979.
- BANERJI, R.; PRAKASH, D.; PATNAIK, G. K.; NIGAM, S. K. Spasmolytic activity of saponins. **Indian Drugs**, v. 20, n. 2, p. 51-54, 1982.
- BARREIROS, A. L.; B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 15-70, 1991.
- BARMAN, D.; DE, L.C.; SHARMA, C.K. Allelopathic effects of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. on germination of aster (*Callistephus chinensis*) and *chrysanthemum*

(*Chrysanthemum coronarium*). **Annals of Plant Physiology**, v. 11, n. 2, p. 212-213, 1997.

BEKKER, P. I.; STEPHEN, A. M.; WOOLARD, G. R. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. IV: Gums of *Acacia podalyriaefolia* and *A. elata*. **Tetrahedron**, v. 24, n. 24, p. 6967-6975, 1968.

BEKKER, P. I.; CHURMS, S. C.; STEPHEN, A. M.; WOOLARD, G. R. structural features of the gums of *Acacia podalyriaefolia* and *Acacia elata*: standardization of the Smith degradation procedure. **Journal of the South African Chemical Institute**, v. 25, n. 2, p. 115-130, 1972.

\_\_\_\_\_. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. V: acid hydrolysis products of the gums of *Acacia podalyriaefolia* and *A. elata*. **Tetrahedron**, v. 25, n. 16, p.3359-3363, 1969.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. Deterrent chemicals as a basis of oligophagy in *Locusta migratoria* L. **Ecological Entomology**, v. 2, p. 1-18, 1977.

BHANUPRAKASH, V.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; GANDHALE, P.; NARESH, R.; SWARUP, D.; SINGH, R. K. In vitro antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, n. 2, p. 120-127, 2008.

BHARGAVA, A.; SRIVASTAVA, A.; KUMBHARE, V. Antifungal activity of polyphenolic complex of *Acacia nilotica* bark. **Indian Forester**, v. 124, n. 5, p. 292-298, 1998.

BHEEMAIAH, G.; SUBRAMANYAM, M. V. R.; ISMAIL, S. Performance of arable crops with *Acacia albida* under different alley widths in dry lands. **Proceedings: First National Symposium. Allelopathy in Agroecosystems (agriculture & forestry)**, February 12-14, p. 120-122, 1992.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macler. Caesalpinaceae**. Curitiba, 2003. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, p. 930-1017, 1990.

- BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 217-222, 2006.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BODET, C.; LA, V.D.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, p. 400-407, 2008.
- BORA, I. P.; SINGH, J.; BORTHAKUR, R.; BORA, E. Allelopathic effect of leaf extracts of *Acacia auriculiformis* on seed germination of some agricultural crops. **Annals of Forestry**, v. 7, n. 1, p. 143-146, 1999.
- BOUHLEL, I.; BEN, M. H.; LIMEM, I.; BEN, S. M.; MAHMOUD, A.; BEN, C. J.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, G. L. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 56-63, 2007.
- BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; NEFATTI, A.; VALENTI, K.; GHEDIRA, K.; MARIOTTE, A. M.; HININGER-FAVIER, I.; LAPORTE, F.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic and antioxidant activities of isorhamnetin 3-O neohesperidoside from *Acacia salicina*. **Drug & Chemical Toxicology an International Journal for Rapid Communication**, v. 32, n. 3, p. 258-267, 2009.
- BURKART, A. Leguminosas - Mimosoideas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: P. Raulino Reitz, v. 1, p.17-48, 1979.
- BUSHNELL, O. A.; FUKUDA, M.; TAKASHY, M. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. **Pacific Sciences**, v. 4, n. 3, p. 167-183, 1950.
- CAETANO, N. N.; FONTE, J. R.; BORSATO, A.V. Sistemas de produção de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, 2003.
- CAI, Y. Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872-288, 2006.

CARBALLEIRA, A.; REIGOSA, M. J. Effects of natural leachates of *Acacia dealbata* link in Galicia (NW Spain). **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 40, n. 1, p. 87-92, 1999.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 167 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, J. L. S. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae**. Curitiba, 2008. Tese (Doutorado em Farmácia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, vol. 32, n. 4, p.1031-1035, 2009.

CASAL, J. F.; REIGOSA, M. J.; CARBALLEIRA, A. Potentiel allelopathique de *Acacia dealbata* Link. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, v. 22, p. 1-12, 1985.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1, 3, 5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Química Nova**, 2000, v. 23, p. 20-22, 2000.

CENCI, F. B.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C. M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D. M.; ARAUJO, S. C.; MINHO, A. P.; ABDALLA, A. L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 132-137, 2007.

CENGIZ; M.; YÜKSEL, A.; SEVEN, M. The effects of carbamazepine and valproic acid on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 4, 2000.

CHANDEL, B. S.; SHAN, N. M.; TRIPATHI, R. M. In vitro antibacterial activity of *Acacia arabica* bark. **Indian Journal of Indigenous Medicines**, v. 9, n. 1-2, p. 77-79, 1993.

- CHANNAL, H. T.; KURDIKERI, M. B.; SARANGAMATH, P. A. Allelopathic effect of tree leaf extracts on germination of sorghum and rice. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 13, n. 2, p. 338-342, 2000.
- CHANG, SHANG-TZEN; WU, JYH-HORNG; WANG, SHENG-YANG; KANG, PEI-LING; YANG, NING-SUN; SHYUR, LIE-FEN . Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 49, p. 3420-3424, 2001.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. A. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.
- CHATTI, I. B.; LIMEM, I.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; KILANI, S.; BHOURI, W.; BEN-SGHAIER, M.; NEFATTI, A.; BEN-MANSOUR, H.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Phytochemical, Antibacterial, Antiproliferative, and Antioxidant Potentials and DNA Damage-Protecting Activity of *Acacia salicina* Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 3, p. 675-683, 2009.
- CHAUBAL, R.; MUJUMDAR, A. M.; MISAR, A.; DESHPANDE, V. H.; DESHPANDE, N. R. Structure-activity relationship study of androstene steroids with respect to local anti-inflammatory activity. **Arzneimittel Forschung**, v. 56, n. 6, p. 394-398, 2006.
- CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. **Radicais Livres em Medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros, p. 4-5, 1996.
- CHHABRA, S. C.; UIISO, F. C. A survey of medicine plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**, v. 4, p.307-316, 1990.
- \_\_\_\_\_. Antibacterial activity of some Tanzanian plants used in traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 62, n. 6, p. 499-503, 1991.
- CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity an free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.
- CHOI, J.S.; PARK, K.Y.; MOON, S.H.; RHEE, S.H.; YOUG, H.S. Antimutagenic effects of plant flavonoids in the Salmonella assay system. *Archives of Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 71-5, 1994.



- CHOU, C. H. The role of allelopathy in subtropical agrosystems in Taiwan. In: PUTNAM, A. R.; TANG, Chung-Shih. **The Science of Allelopathy**. Toronto: John Wiley & Sons, p. 57-73, 1986.
- CHOU, C. H.; FU, C. Y.; LI, S. Y.; WANG, Y. F. Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 12, p. 2131-2150, 1998.
- CHOWDHURY, A. K. A.; KHALEQUE, R. A.; CHAKDER, S. K. Antifertility activity of a traditional contraceptive pill comprising *Acacia catechu*, *acacia Arabica* and *Tragia involucrata*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 80, p. 372-374, 1984.
- CHURMS, S. C.; STEPHEN, A. M. Acid hydrolysis of the polysaccharide gum from *Acacia podalyriaefolia*: molecular-weight distribution studies. **Carbohydrate Research**, v. 15, n. 1, p. 11-19, 1970.
- CHURMS, S. C.; MERRIFIELD, E. H.; STEPHEN, A. M. Structural features of the gum exudates from some *Acacia* species of the series Phyllodineae and Botrycephalae. **Carbohydrate Research**, v. 55, n. 1, p. 3-10, 1977.
- CLARK, D. T. *et al.* The effects of *Acacia arabica* gum on the vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, n. 4, p. 238-243, 1993.
- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, n. 73, p. 479-483, 2002.
- CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 16-18 e 310, 1984.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v.2, p.195, 1986.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988.
- CROZIER, A. *et al.* Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. **Biological Research**. Santiago, v. 33, n. 2, 2000.
- CUNICO, M. M.; LOPES, A. R.; COCCO, L.; YAMAMOTO, C. I.; PLOCHARSKI, R. C. B.; MIGUEL, M.; JUNIOR, A. G.; AUER, C. G.; MIGUEL, O. G. Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 184-188, 2007.

- DAFALLAH, A. A.; AL-MUSTAFA, Z. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, n. 3-4, p. 263-269, 1996.
- DASTUR, J. F. **Useful Plants of India and Pakistan**. Bombay: Taraporevala Sons and Co. Ltda, p. 132, 1977.
- DAVIES, R. A.; LLOYD, K. M. **INDEX KEWENSIS** . Suplemento 19. Oxford: Clarendon Press, p. 275, 1991.
- DAYDON, J. B. **INDEX KEWENSIS**. 1 ed. Oxford: Great Britain at the University Press, v. 1, p. 08 e 11, 1895.
- DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neurosciences Method**, v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.
- DHAWAN, S. R.; POONAM, D.; DHAWAN, P. Biocontrol of congress grass: studies on seed germination. **World Weeds**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 1995.
- DIGRAK, M.; ALMA, M. H.; ILCIM, A.; SEN, S. Antibacterial and antifungal effects of various commercial plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n.3, p. 216-220, 1999.
- DJEGO, J.; SINSIN, B. Effect of introduced exotic trees on the species diversity of the plant communities of their undergrowth. **Systematics and Geography of Plants**, v. 76, n. 2, p. 191-209, 2006.
- DONGMO, A. B.; NGUELEFACK, T.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* Wild. (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 201-206, 2005.
- DRAI, J.; BANNIER, E.; CHAZOT, C.; HUROT, J. M.; GOEDERT, G.; JEAN, G.; CHARRA, B.; LAURENT, G.; BALTASSAT, P.; REVOL, A. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. **Il Farmaco**, v. 56, p. 436-465, 2001.
- DUARTE, M. R.; WOLF, S. Anatomical characters of the phyllode and stem of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 71-76, 2005.
- DUDAI, N.; RAZ, A.; HOFESH, N.; ROZENZWEIG, N.; AHARON, R.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SEGEV, D. Antioxidant activity and phenol content of plant

- germplasm originating in the Dead Sea area. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 56, n. 3, p. 227-232, 2008.
- DUROUX, L.; DELMOTTE, F. M.; LANCELIN, J. M.; KERAVIS, G.; ALLEMAND, C. Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. **Biochemical Journal**, v. 333, n. 2, p. 275-283, 1998.
- DWIVEDI, S. C.; BAJAJ, M. Efficacy of *Acacia nilotica* leaf extract as pupicidal against *Trogoderma granarium* (Everts). **Journal of Experimental Zoology India**, v. 3, p. 153-155, 2000.
- DWIVEDI, S. C.; GARG, S.; KUMARI, A. Screening of new mosquito larvicides from plants of semiarid zone. **Indian Biologist**, v. 32, p. 25-28, 2000.
- EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA 102. **Mutation Research**, v. 540, p.1-18, 2003.
- EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R.; TANG, Chung-Shih. **The Science of Allelopathy**. Toronto: John Wiley & Sons, p. 171-187, 1986.
- ELDEEN, I. M. S.; ELGORASHI, E. E.; STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 457-464, 2005.
- ELDEEN, I. M. S.; VAN STADEN, J. Cyclooxygenase inhibition and antimycobacterial effects of extracts from Sudanese medicinal plants. **Journal of Botany**, v. 74, n. 2, p. 225-229, 2008.
- EL-SAWI, S. H. A New rare 8-C-glucosylflavonoid and other eight flavonoids from the molluscicidal plant *Acacia saligna* Wendl. **Pharmaceutical Pharmacology Letters**, v. 11, n. 1, p. 30-33, 2001.
- EL-SAWI, S. A.; HASHEM, F. A.; BIUOMY, A. R. Investigation of lipid and volatile oil contents from the aerial parts of *Acacia saligna* Wendl and its anti-inflammatory activity. **Bulletin of the National Research Centre Cairo**, v. 28, n. 1, p. 21-33, 2003.

- ELSHEIKH, S. H.; BASHIR, A. K.; SULIMAN, S. M.; WASSILA, M. E. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercariae and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, n. 4, p. 241-245, 1990.
- ERAWARAMURTHY, S.; MUTHUSWAMY, M.; MUTHUSWAMY, S.; MARIAPPAN, V. Inhibitory effects of Neem, *Acacia*, *Prosopis* and *Ipomoea* extracts on *Sarocladium oryzae* and *Fusarium oxysporum* F. spp. *Cepae*. **Neem News Letters**, v. 6, p. 4-5. 1989.
- EVANS, C. S.; BELL, E. A. Non-protein amino acids of *Acacia* species and their effect on the feeding of the acrids *Anacridium melanorhodon* and *Locusta migratoria*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1807-1810, 1979.
- EVANS, C. S.; QURESHI, M. Y.; BELL, E. A. Free amino acids in the seeds of *Acacia species*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 565-570, 1977.
- EVELYN, K. A.; MALLOY, H. A. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 126, p. 655-664, 1938.
- FADL, EL M. A. Management of *Prosopis juliflora* for use in agro forestry systems in the Sudan. **Tropical Forestry Reports**, n. 16, p. 107, 1997.
- FAJARDO, I.; DIEZ, E.; RODRIGUEZ, C. C.; QUESADA, A. R.; SANCHEZ-JIMENES, F.; MEDINA, M. A. Effects of genistein and 2-methoxyestradiol on matrix metalloproteinases and their inhibitors secreted by Ehrlich ascites tumor cells. **Anticancer Research**, v. 20, p. 1691-1694, 2000.
- FEMIA, A.P.; CADERNI, G.; BUZZIGOLI, C.; COCCA, E.; SALVADORI, M.; DOLARA, P. Effect of simple phenolic compounds on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. **Nutrition and Cancer**, v. 41, n. 1-2, p. 107-110, 2001.
- FERRALI, M. SIGNORINI, C. CICCOLI, L.; COMPORTI, M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. **Biochemical Journal**, v. 285, p. 295-301, 1992.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, A. L. A.; MACHADO, P. E. A.; MATSUBARA, L. S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal

- iron hydroxide *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999.
- GARCIA, S.; ALARCO, G.; RODRIGUEZ, C.; HEREDIA, N. Extracts of *Acácia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 669-674, 2006.
- GHOSH, N. K.; SINHA, B.; SUKUK, N. C.; MAHATO, S. B. Antifilarial effect of two terpenoids isolated from *Acacia auriculiformis*. **Indian Journal of experimental Biology**, v. 31, n. 7, p. 604-606, 1993.
- GHOSH, N. K.; SINHA, B.; SUKUK, N. C.; ITO, A. Cestocidal activity of *Acacia auriculiformis*. **Journal of Helminthology**, v. 70, n. 2, p. 171-172, 1996.
- GILANI, A. H.; SHAHEEN, F.; ZAMAN, M.; JANBAZ, K. H.; SHAH, B. H.; AKHTAR, M. S. Studies on antihypertensive and antispasmodic activities of methanol extract of *Acacia nilotica* pods. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 8, p. 683-685, 1999.
- GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. Seção XII. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: **Goodman & Gilman: As Bases farmacológicas da Terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 799, 1991.
- GONZALES, L.; SOUTO, X. C.; REIGOSA, M. J. Allelopathic effects of *Acacia melanoxylon* R. Br. Phyllodes during their decomposition. **Forest Ecology**, v. 77, n. 1-3, p. 53-63, 1995.
- GÓTH, L.; VITAI, M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 8, p. 882-888, 2003.
- GRAINGE, M.; AHMED, S. **Handbook of Plants with Pest Control Properties**. New York: John Wiley and Sons, p. 2-4, 1988.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.13-26, 2001.
- GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIREÇCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisun* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

- GYAMFI, M. A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology**, v. 32, p. 661-667, 1999.
- HAGOS, M.; SAMUELSSON, G. Quantitative determination of Quracol A, B and (+)-fisetinidol in bark and gum of *Acacia tortilis*. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v. 25, n. 6, p. 321-324, 1988.
- HALIMA, N.; KHAN, U.; ABDUL, H. Clinical evaluation of unani medicine for infective vaginal discharge. **Journal of Traditional Medicines**, v. 22, n. 6, p. 301-307, 2005.
- HANAUSEK, M.; GANESH, P.; WALASZEK, Z.; ARNTZEN, C. J.; SLAGA, T. J.; GUTTERMAN, J. U. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11551-11556, 2001.
- HANZA, O. J. M.; BEUKEL, C. J. P. B.; MATEE, M. I. N.; MOSHI, M. J.; MIKX, F. H. M.; SELEMANI, H. O.; MBWAMBO, Z. H.; VEN, A. J. A. M.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 124-132, 2006.
- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. 2 ed. Philadelphia: Taylor & Francis, p. 420-817, 1999.
- HARIDAS, V.; HIGUCHI, M.; JAYATILAKE, G. S.; BAILEY, D.; MUJOO, K.; BLAKE, M. E.; ARNTZEN, C. J.; GUTTERMAN, J. U. Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5821-5826, 2001.
- HEWAMANNA, R.; ANURAADHAI, N.; FERNANDO, R. K. S. Analysis of five trace elements in medicinal plants used in Ayurvedic medicine to control diabetes. **Journal of Tropical Medicinal Plants**, v. 5, n. 2, p. 211-215, 2004.
- HOFFMANN, J. J.; TIMMERMANN, B. N.; MCLAUGHLIN, S. P.; PUNNAPAYAK, H. Potential activity of plants from the Southwestern United States. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 2, p. 101-115, 1993.

- HORN, D. H. S.; KRANZ, Z. H.; LAMBERTON, J. A. The composition of *Eucaliptus* and some other leaf waxes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 464-476, 1964.
- HORN, D. H. S.; LAMBERTON, J. A. Long-chain  $\beta$ -diketones from plant waxes. **Chemistry and Industry**, p. 2036-2037, 1962.
- HOSSAIN, M. K.; DHALI, M. A. H.; HOSSAIN, M. S. Effects of forest soil and leaf-litter on germination and initial seedling growth of *Leucaena leucocephala*. **Allelopathy Journal**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 2002.
- HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 253-261, 2006.
- HUSSEIN, A. S. M. Molluscicidal properties of *Acacia nilotica* sub specie *tomentosa* and *adstringens* (1). **Fitoterapia**, v. 54, p. 183-187, 1983.
- HUSSEIN, A. S. M. Effect of galloyl group on the molluscicidal activity of tannins. **Fitoterapia**, v. 55, p. 343-345, 1984.
- HUSSEIN, A. S. M.; YANKOV, L. K. The algicidal properties of tannins. **Fitoterapia**, v. 56, p. 227-229, 1985.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 31-36, 1999.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 510-516, 2000.
- HYALIJ, M. J. Effect of molluscicides and cercaricides on some freshwater snails and cercariae. **Geobios**, v. 26, n. 4, p. 211-213, 1999.
- JADHAV, B. B.; GAYNAR, D. G. Allelopathic effects of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. on germination of rice and cowpea. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 86-89, 1992.
- JAGANNATHAN, R.; SIVAPRAKASAM, K. Effect of botanicals on managing sheath rot of rice. **International Rice Research Notes**, v. 21, n. 1, p. 49-50, 1996.
- JANARDHANAN, K. K.; GANGULI, D.; BARUAH, J. N.; RAO, P. R. Fungitoxicity of extracts from tannin bearing plants. **Current Science**, v. 32, p. 226-227, 1963.

- JAYASEKHAR, P.; MOHANAN, P. V.; RATHINAM, K. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 426-428, 1997.
- JAYATILAKE, G. S.; FREEBERG, D. R.; LIU, Z.; RICHHEIMER, S. L.; BLAKE, M. E.; BAILEY, D.; HARIDAS, V.; GUTERMAN, J. U. Isolation and structures of avicins D and G: in vitro tumor-inhibitory saponins derived from *Acacia victoriae*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 779-783, 2003.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998.
- JOHN, J.; NAIR, A. M. Preliminary investigations on the allelopathic influence of leaf litter of certain multipurpose trees. **Indian Journal of Forestry**, v. 22, n. 1-2, p. 66-69, 1999.
- JURKOVIC, P.; SENTJURC, M.; GASPERLIN, M.; KRISTL, J.; PECAR, S. Skin protection against ultraviolet induced free radical with ascorbyl palmitate in microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 59-66, 2003.
- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v. 73, p. 245-250, 2001.
- KAMAL, S.; DHIMAN, R. C.; JOSHI, N. K. Allelopathic effect of some tree species on wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Research**, v. 9, n. 1, p. 101-105, 1997.
- KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A. J. An ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted disease (njovera) in Guruve District, Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n.1, p. 5-9, 2001.
- KANYARA, J. N.; NJAGI, E. N. M. Anti-HIV-1 activities in extracts from some medicinal plants as assessed in an *in vitro* biochemical HIV-1 reverse transcriptase assay. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 287-290, 2005.
- KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. Variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of fresh and dried *Acacia* leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 2, p. 303-305, 2004.
- KAUR, K.; ARORA, S.; HAWTHORNE, M. E.; KAUR, S.; KUMAR, S.; MEHTA, R. G. A correlative study on antimutagenic and chemopreventive activity of *Acacia*



*auriculiformis* A. Cunn. and *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex Del. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 39-64, 2002.

KAUR, K.; MICHAEL, H.; ARORA, S.; HÄRKÖNEN, P.; KUMAR, S. In vitro bioactivity-guided fractionation and characterization of polyphenolic inhibition fractions from *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Del. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 353-360, 2005.

KELLER, J. N.; LAUDERBACK, C. M.; BUTTERFIELD, D. A.; KINDY, M. S.; MARKESBERY, W. R. Amyloid-beta peptide effects on synaptosomes from Apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 1579–1586, 2000.

KERBER, V. A. **Flavonóides e Cumarinas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE (FLORES)**. Porto Alegre, 1988. 171 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KERBER, V.A.; SILVA, G.A.A.B. Flavonóides da *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. - Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p 16-18, 1993.

KHAFAGI, I. K. Screening in vitro cultures of some Sinai medicinal plants for their antibiotic activity. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 613-627, 1999.

KHAFAGI, I. K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 71, p. 365-376, 2000.

KHALID, F. A.; ABDALLA, N. M.; MOHOMED, H. E. O.; TOUM, A. M.; MAGZOUN, M. M. A.; ALI, M. S. In vitro assessment of anti-cutaneous leishmaniasis activity of some Sudanese plants. **Turkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 29, n. 1, p. 3-6, 2005.

KHAN, M. R; NDAALIO, G.; NKUNYA, M. H. H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A. N. Studies on African plants: 1- Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. **Planta Medica**, Suppl., p. 91-7, 1980.

KHAN, M. R.; NGASSAPA, O.; MATEE, M. I. N. Antimicrobial activity of Tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 235-240, 2000.

KITOU, M.; YOSHIDA, S. Difference of phytotoxicity between undecomposed and microbially decomposed plant residues. **Weed Research Tokyo**, v. 38, n. 1, p. 43-46, 1993.

\_\_\_\_\_. Allelopathic effects of extracts of soil amended with some plant material on germination and radicle elongation of lettuce. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 1998.

KOLEVA, I. I.; BEEK, T. A. van; LINSSEN, J.P.; GROOT, A. de; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, n. 13, v. 1, p. 8-17, 2002.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. *et al.* Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. **Clinica Chimica Acta**, v. 300, p. 107-117, 2000.

KONEMAN, E. W.; ALLENS, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnostic Microbiology**. 4 ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, p. 618-650, 1992.

KOUL, V. K.; RAINA, A.; KHANNA, Y. P.; TICKOO, M. L.; SINGH, H. Evaluation of allelopathic influence of certain farm growth tree species on rice (*Oriza sativa* L. c.v. P.c. 19). **Indian of Forestry**, v. 14, n. 1, p. 54-57, 1991.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KRISHNA, A.; MANJUNATH, G. O.; RAMESH, R. Effect of casuarinas, mango, eucalyptus and acacia leaf leachates on seed germination of Kasthuri bendi, sankha pushpa and Honey plants. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 18, n. 1, p. 205-207, 2005.

KUJALA, T. S.; LOPONEN, J. M.; KLIKA, K. D.; PIHLAJA, K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5338-5342, 2000.

KUMAR, S. S.; NETHAJI, R.; SIVAKUMAR, T.; PERUMAL, P. Pharmacological and pharmacognostical studies on leaves of *Acacia dealbata* Linn. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 44-51, 2004.

- LALL, N.; MEYER, J. J. M. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 347-354, 1999.
- LEA, P. J.; LEEGOOD, R. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. West Sussex : John Wiley & Sons Ltd, p. 192, 1993.
- LEE, M. K.; BOK, S. H.; JEONG, T. S.; MOON, S. S.; LEE, S. E.; PARK, Y. B.; CHOI, M., S. Supplementation of naringenin and its synthetic derivatives alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. **Source Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 2239-2244, 2002.
- LEE, M. H.; YOON, S.K.; MOON, J.O.K. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine – induced liver damage in rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 72-76, 2004.
- LEE, T. H.; QIU, F.; WALLER, G. R.; CHOU, C. H. Three new flavanol galloyl glycoside from leaves of *Acacia confusa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 710-712, 2000.
- LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LI, R. W.; MYERS, S. P.; LEACH, D. N.; LIN, G. D.; LEACH, G. A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 25-32, 2003.
- LI, X.; DAVIS, B.; HARIDAS, V.; GUTTERMAN, J. U.; COLOMBINI, M. Proapoptotic triterpene electrophiles (avicins) from channels in membranes: cholesterol dependence. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 4, p. 2577-2584, 2005.
- LIBERTI, L. *Acacia* gum: a monograph. **The Review of Natural Products**, v. 1-2, 1994.
- LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais Sob a Ótica da Química Moderna**. Chapecó: Argos, p. 481-500, 2001.
- LIN, AN-SHEN *et al.* Acasiane A and B and farnesirane A and B diterpene derivatives from the roots of *Acacia farnesiana*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 256-261, 2009.
- LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 725-735, 2000.

- LIU, Z. Q.; HAN, K.; LIN, Y. J.; LUO, X. Y. Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivation on free-radical-initiated hemolysis of erythrocytes is due to its distributive status. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1570, p. 97-103, 2002.
- LOPEZ, R.; SALAZAR, L.; ESTRADA, S. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 725-728, 2003.
- MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, p. 35-279, 1970.
- MAHATO, S. B. Saponins with antifilarial activity from *Acacia auriculiformis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 404, p. 173-184, 1996.
- MAHATO, S. B. Chemistry of some natural products of biological interest. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23, p. 387-529, 2000.
- MALDINI, M.; SOSA, M.; MONTORO, P.; GIANGASPERO, A.; BALICK, M. J.; PIZZA, C. Screening of topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdnow, *Byrsonia crassifolia* Kunth, *Swertia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 430-433, 2009.
- MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523, 2001.
- MANJIT, S.; JINDAL, S. K.; SOLANKI, K. R.; KACKAR, N. L. Growth height of *Prosopis cineraria* (L.) Druce in association with *Acacia tortilis* and *Azadirachta indica*. **Myforest**, v. 27, n. 4, p. 348-350, 1991.
- MANDAL, P.; BABU, S. P.; MANDAL, N. C. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 462-465, 2005.
- MANN, J. *et. al.* **Secondary Metabolism**. 2. ed., Oxford: Clarendon Press, p.275-283, 1999.
- MANSOUR, S. A.; IBRAHIM, A. M.; KHATTAB, A. A.; ABDEL HAMID, H. F. Botanical Biocides 7: efficacy of certain plants as dry powder against *Biomphalaria alexandrina* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia and cercariae. **Egyptian Journal of Schistosomiasis and Endemic Infectious Diseases**, v. 23, p. 73-89, 2001.

- MANSOUR, H. B.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; MAHMOUD, A.; BERNILLON, S.; CHIBANI, J. B.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, G. L. Antigenotoxic activities of crude extracts from *Acacia salicina* leaves. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 1, p. 58-66, 2007.
- MANSOUR, S. A.; IBRAHIM, A. M.; ABDEL HAMID, H. F. Botanical Biocides 8: Impact of some plant extracts on *Biomphalaria alexandrina* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia and cercariae. **Egyptian Journal of Schistosomiasis and Endemic Infectious Diseases**, v. 21, p. 81-99, 2002.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia de Angiospermas**: família Leguminosae. Santa Maria: UFSM, 1997, 200 p.
- MARWAH, R. G.; FATOPE, M. O.; AL-MAHROOQI, R.; VARMA, G. B. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 465-470, 2007.
- McGRAW, L. J.; JAGER, A. K.; VAN STADEN, J. Prostaglandin sintesis inhibitory activity in Zulu, Xhosa and Sotho medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 113-117, 1997.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.
- MEDEIROS, A. R. M. Alelopatia. **Horti Sul**, v. 1, n. 3, p. 27-32, 1990.
- MEENA, P. D.; MEENA, R. L.; CHATIOPADRYAY, C.; KUMAR, A. Identification of critical stage for disease development and biocontrol of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 204-209, 2004.
- MEERA, B.; CHANDER, J.; KALIDHAR, S. B. A review on the chemistry and bioactivity of the *Acacia* spp. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 27, p. 51-90, 2005.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

- MIHARA, R.; BARRY, K. M.; MOHAMMED, C. L.; MITSUNAGA, T. Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* heartwood extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 4, p. 789-804, 2005.
- MISHRA, A. S.; RAO, G. P. Inhibition of tobacco mosaic virus by root extracts of higher plants. **Phytophylactica**, v. 20, n. 1, p. 93-94, 1988.
- MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MOREIRA, E. A. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeladii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 13-39, 1979.
- MORIMURA, K. I.; GATAYAMA, A.; TSUKIMATA, R.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; HIRATA, E.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M.; TAKEDA, Y. 5-O-Glucosyldihydroflavones from the flowers of *Helicia cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2681-2685, 2006.
- MOUHAJIR, F.; HUDSON, J. B.; REJDALI, M.; TOWERS, G. H. N. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants uses by Berber peoples of Morocco. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 5, p. 364-374, 2001.
- MUJOO, K. *et al.* Triterpenoids saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. **Cancer Research**, v. 61, n. 14, p. 5486-5490, 2001.
- MURUGESAN, S.; MOHAN, V.; SUNIHA, B.; BALU, A. Antifungal activity of *Acacia nilotica* (babul) plant extracts against some fungal isolates. **Myforest**, v. 38, n. 4, p. 351-355, 2002.
- MUSTAFA, N. K.; TANIRA, M. O. M.; DAR, F. K.; NSANZE, H. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* subsp. *nilotica* fruit extracts. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n. 9, p. 583-586, 1999.
- MUTAI, C.; ABATIS, D.; VAGIAS, C.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1159-1164, 2004.

- MUTAI, C.; BIL, C.; VAGIAS, C.; ABATIS, D.; ROUSSIS, V. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 143-148, 2009.
- NABI, A. B. D.; NABI, A. B. D.; REISINGER, E. C.; REINTHALER, F. F.; STILL, F.; EIBEL, U.; KREJS, G. J. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *nilotica* (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 77-79, 1992.
- NAHMIAS, Y.; GOLDWASSER, J.; CASALI, M.; POLL, D.V.; WAKITA, T.; CHUNG, R.T.; YARMUSH, M.L. Apolipoprotein  $\beta$ -dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. **Hepatology**, v. 47, p. 1437-1445, 2008.
- NAIK, G. H.; PRIYADARSINIK, K.; SATAU, J.G.; BANAVALLIKAR, M. M.; SOHONI, D. P.; BIYANI, M.; MOHAN, H. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 97-104, 2003.
- NANDI, B.; ROY, S.; BHATTACHARYA, S.; BABU, S. P. S. Free radicals mediated membrane damage by the saponins acaciaside A and acaciaside B. **Phytoterapy Research**, v. 18, n. 3, p. 191-194, 2004.
- NASSAR, M. I. Apigenin-C-glycoside from de leaves of *Acacia laeta* and their anticancer activity evaluation. **Egypt Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 1, p. 73-77, 1999.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Tropical Legumes - Resources for the Future**. Washington: National Academy Press, p.241, 1979.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 4 ed. M7-A4. Wayne. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- NAZIF, N. M.; SOLIMAN, A. M.; RADWAN, H. M. Bioassay guided isolation of molluscicides from certais medicinal plants. **Hamdard Medicus**, v. 44, n. 2, p. 33-37, 2001.
- OGUNDAINI, A.; FARAH, M.; PERERA, P.; SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. Isolation of two new antiinflammatory biflavanoids from *Sarcophyte piriei*. **Journal of natural Products**, v. 59, p. 587-590, 1996.

- OLIVEIRA, M. M.; SAMPAIO, M. R. R.; SIMON, F.; GILBERT, B.; MORS, W. B. Antitumor activity of Condensed Flavanols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 44, n. 1, p. 41-44, 1972.
- OMER, M. E. A.; AL MAGBOUL, A. Z.; EL EGAMI, A. A. Sudanese plants used in Folkloric medicine: screening for antibacterial activity. Part IX. **Fitoterapia**, v. 69, n. 369, p. 542-546, 1998.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 2, v. 18, p. 301-307, 2008.
- PAKRASHI, A.; RAY, H.; PAL, B. C.; MAHATO, S. B. Sperm immobilizing effect of triterpene saponins from *Acacia auriculiformis*. **Contraception**, v. 43, n. 5, p. 475-483, 1991.
- PAKULSKI, G.; BUDZIANOWSKI, J. Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 775-778, 1996.
- PALOMBO, E. A.; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p. 151-157, 2001.
- \_\_\_\_\_. Antibacterial activity of traditional Australian plants extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 444-448, 2002.
- PANDEY, B. P.; MOHAN, J. Inhibition of turnip mosaic virus by plant extracts. **Indian Phytopathology**, v. 39, p. 489-491, 1986.
- PAREDES, A.; ALZURU, M.; MENDEZ, J.; ORTEGA, M.R. 2003. Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 108-109, 2003.
- PARK, S. N.; BOO, Y. C. Flavonoids for protection of cells against chemically active species of oxygen, their extraction from plants, and their use in cosmetics. **Fr. Demande**, 1991, 17 p.
- PARK, Y. K.; PARK, E.; KIM, J.; KANG, M. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. **Mutation Research**, v. 529, p. 77-86, 2003.



- PARIDHAVI, M.; AGRAWAL, S. S. Isolation, characterization and antimicrobial activity of *Acacia leucophloea*. **Biomed**, v. 1, n. 1, p. 46-50, 2006.
- PATEL, J. D.; KUMAR, V.; BHATT, S. A. Antimicrobial screening and phytochemical analysis of the resin part of *Acacia catechu*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 34-37, 2009.
- PATIL, V. S.; KULKARNI, S. Bio-efficacy of certain botanicals against colony growth and spore germination of *Exserohilum hawaiiensis* a causal agent of leaf blight of wheat. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 2, p. 391-396, 2002.
- PEITZ, C. **Estudo Fitoquímico, Alelopático e Microbiano de *Acacia longifolia* Andr. (Willd.)**. Curitiba, 2003. 79 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- PEITZ, C.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 61-65, 2003.
- PENNACCHIO, M.; KEMP, A. S.; TAYLOR, R. P.; WICKENS, K. M.; KIENOW, L. Interesting biological activities from plants traditionally used by native Australians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 597-601, 2005.
- PEREIRA, S. I.; FREIRE, C. S. R.; PASCOAL-NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, A. M. S. Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus globules*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 364-369, 2005.
- PHADNIS, A. K.; TAKTE, P. A.; SINGH, K. K. Antimicrobial activity of bark of *Acacia nilotica*. **Indian Journal of Natural Products**, v. 22, n. 1, p. 24-25, 2006.
- POLHILL, R. M.; HAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics**. England: Royal Botanic Gardens, v. 1 e 2, p. 1-145 e 427-1049, 1981.
- POPOCA, J.; AGUILAR, A.; ALONSO, D.; VILLAREAL, M. L. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 173-177, 1998.
- POSER, G. L. Von; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 63-76, 2001.

- PRABAKARAN, G.; VIJAYALAKSHIMI, P. Antibacterial activity of traditional medicinal plant extracts against dental caries isolate *Streptococcus mutans*. **Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring**, v. 15, n. 3, p. 223-227, 2005.
- PRETORIUS, J. C.; MAGAMA, S.; ZIETSMAN, P. C. Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plants species. **South African Journal of Botany**, v. 69, n. 2, p. 186-192, 2003.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.
- QADRI, S. S. H. Some new indigenous plant repellents for storage pests. **Pesticides**, v. 7, p. 18-19, 1973.
- RABE, T.; STADEN, J. Van. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 81-87, 1997.
- RAJENDRAN, R.; KAREEM, A. A. Antifeedant properties of certain plant products and organotins against tortoise beetle *Chirida bipunctata* F. on sweet potato. **S India Hort**, v. 25, p. 14-19, 1977.
- RAMIREZ-MARES, M. V.; MEJIA, E. G. Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1527-1535, 2003.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: \_\_\_\_\_. **Farmacologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 152-174, p. 477-490, 1993.
- RANI, P.; KHULLAR, N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 670-673, 2004.
- RAO, O. P.; SAXENA, A. K.; SINGH, B. P. Allelopathic effects of certain agroforestry tree species on the germination of wheat, paddy and gram. **Annals of Forestry**, v. 2, n. 1, p. 60-64, 1994.
- RAY, D.; SHARATCHANDRA, K.; THOKCHAM, I. S. Antipyretic, antidiarrhoeal, hypoglycaemic and hepatoprotective activities of ethyl acetate extract of *Acacia*

*catechu* Willd. in albino rats. **Indian Journal of Pharmacognosy**, v. 38, n. 6, p. 408-413, 2006.

RENUGADEVI, J.; PRABU, M. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. **Toxicology**, v. 256, p. 128-134, 2009.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 41-62, 2001.

RENU. Fungitoxicity of leaf extracts of some higher plants against *Rhizoctonia solani* Kuchm. **National Academy of Science Letters**, v. 6, p. 245-246, 1983.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80, 2005.

RISK, A. M.; WILLIAMSON, E. M.; EVANS, F. J. Constituents of plants growing in Qatar. VII. An examination of certain plants for anti-inflammatory activity. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 23, n. 1, p. 1-4, 1985.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Exploitation on allelochemicals in improving crop productivity. In: \_\_\_\_\_. **Allelopathy: basic and applied aspects**. 1 ed., Londres: Chapman & Hall, p. 443-472, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p. 157 - 158, 1997.

RODRIGUEZ, A. T.; MORALES, D.; RAMIREZ, M. A. The effect of plant extracts on *in vitro* phytopathogenic fungal growth. **Cultivos Tropicales**, v. 21, n. 2, p. 79-82, 2000.

ROHINI, C.; MUJUMDAR, A. M.; PURANIK, V. G.; DESHPANDE, V. H.; DESHPANDE, N. R. Isolation and X-ray study of anti-inflammatory active androstene steroids from *Acacia nilotica*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 287-288, 2003.

RUTHERFORD, M. C.; POWRIE, L. W. Allelochemic control of biomass allocation in interacting shrub species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 5, p. 893-906, 1993.

SAINI, M. L.; SAINI, R.; ROY, S.; KUMAR, A. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of *Acacia* species (Mimosaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 378-386, 2008.

SAITO, N.; CHENG, J.; ICHIMURA, M.; YOKOI, M.; ABE, Y.; HONDA, T. Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 687-691, 1994.

- SALAZAR, S. F. M.; VERDUGO, A. E.; LÓPEZ, C. C.; MARTÍNEZ, E. B.; CANDELAS, T. M.; ROBLES-ZEPEDA, R. E. Activity of medicinal plants, used by native populations from Sonora, Mexico, against enteropathogenic bacteria. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 10–11, p. 732–737, 2008.
- SALGADO, S.C.; ANDRADE, R.R.; CRESPO, F.A.; GALICIA, J.V.; RIVERA, I.L.; MONTES, S.; MOLINA, R.V.; SOTO, S.E. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 400-405, 2007.
- SALEEM, A.; AHOTUPA, M.; PIHLAYA, K. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 56, n. 11-12, p. 973-978, 2001.
- SANCHEZ, S. R. P.; CHE, E. O. C.; SANCHEZ, E. R. Screening of Yucatecan plant extracts to control *Colletotrichum gloeosporioides* and isolation of a new pimarene from *Acacia pennatula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2429-2432, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121-137, 2002.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; ANGELES, F. M.; MELCHOR, V. V.; CONDEZO, L. A.; LAO, J.; MILLER, M. J. S. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lipidium meyenii*). **Food Chemistry**, n. 79, p. 207-213, 2002.
- SANKER, K. B.; RAÍ, R. S. V. Allelopathic effects of a few tropical hardwoods on olericultural crops. **Indian Journal of Forestry**, v. 16, n. 3, p. 246-249, 1993.
- SANTOS, E. L.; COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; VAZ, N. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MAGALHÃES, E. G.; TOZZI, A. M. A. Toxicidade e atividade antioxidante de flavonóides das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes*. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2255-2258, 2009.
- SAPONARA, S.; TESTAI, L.; LOZZI, D.; MARTINOTTI, E.; MARTELLI, A.; CHERICONI, S.; SGARAGLI, G.; FUSA, F.; CALDERONE, V. 2006. (+/-) Naringenin as large conductance  $Ca^{+2}$  activated  $K^{+}$  ( $BK_{Ca}$ ) channel opener in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 1013-1021, 2006.

- SARKAR, P.; SINHA-BABU, S. P.; SUKUL, N. C. Antifilarial effect of a combination of botanical from *Acacia auriculiformis* and *Centella asiatica* on canine dirofilariasis. **Pharmaceutical Biology**, V. 36, P. 107-110, 1998.
- SATISH, S.; RAVEESHA, K. A.; JANARDHANA, G. R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 145-147, 1999.
- SAWANGJAROEN, N.; SAWANGJAROEN, K. The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the in vitro growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 67-72, 2005.
- SCHULTZ, A. R. **Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática**. 6 ed. Porto Alegre: Globo, v. 2, p. 149, 229 e 236, 1990.
- SCHUMANN, A. W.; LITTLE, K. M.; ECCLES, N. S. Suppression of seed germination and early seedling growth by plantation harvest residues. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 12, n. 4, p. 170-172, 1995.
- SEEMA, A.; MASSOD, A.; DAR, M. Y. Toxicity studies on a unani herbal formulation "Qurs-e-mubarak" in albino rats. **Indian Journal of Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2002.
- SEIGLER, D. S. Phytochemistry of *Acacia –sensu lato*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 345-373, 2003.
- SEKINE, T.; FUKASAWA, N.; IKEGAMI, F.; SAITO, K.; FUJII, Y.; MURAKOSHI, I. Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxiamide from the seeds of the Thai medicinal plant *Acacia concinna*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 148-151, 1997.
- SENEVIRATNE, A. S.; FOWDEN, L. The amino acids of genus *Acacia*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1039-1045, 1968.
- SEO, Y. H.; ABDEL-KADER, J.; MALONE, M.; DERVELD, S.; ADAMS, I.; WERKHOVEN, H.; WISSEI, M. C. M.; MAMBER, J. H.; DALTON, S. W.; KINGSTON, J. M. Bioactive saponins from *Acacia tenuifolia* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 170-174, 2002.

- SETHI, N.; NATH, D.; SINGH, R. K. Tetralogical evaluation of some commonly used indigenous antifertility plants in rats. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 27, p. 118-120, 1989.
- SHAH, B. H.; BASMAH, S.; VIRANI, S. S.; NAWAZ, Z.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. The antiplatelet aggregatory activity of *Acacia nilotica* is due to blockade of calcium influx through membrane calcium channels. **General Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 251-255, 1997.
- SHAM, J. S. K.; CHIU, K. W.; PANG, P. K. T. Hypotensive action of *Acacia catechu* leaves. **Planta Medica**, v. 50, p. 177-180, 1984.
- SHARMA, M.; SAXENA, S. K. Effect of soil amendment with roots of *Acacia nilotica* on growth of *Eucalyptus globulus*. **The Indian Forester**, v. 119, n. 12, p. 1020-1021, 1993.
- SIGHAL, P. C.; JOSHI, L. D. Role of gum Arabic and gum catechu in glycemia and cholesterolemia. **Current Science**, v. 53, p. 91, 1984.
- SILVA, V. C. **Análise dos Flavonóides de *Acacia longifolia* Andr. (Willd.) Leguminosae-Mimosoideae**. Curitiba, 2001. 81 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5 ed. New York: John Wiley, 1991. 419 p.
- SINGH, J.; LAKSHMINARAYANA, K. Effect of allelopathic rhizosphere of *Acacia nilotica* on *Azotobacter chroococcum* and *Rhizobium cowpea*. **Proceedings: First National Symposium. Allelopathy in agroecosystems (agriculture & forestry)**, February 12-14, 1992.
- SINGH, R. K.; SINGH, D. P.; PATHAK, R. C. Antiviral activity of indigenous plants. **Indian Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 2, p. 10-19, 1994.
- SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 505-511, 2007.
- SINGH, B. N.; SINGH, B. R.; SARMA, B. K.; SINGH, H. B. Potential chemoprevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by polyphenolics from *Acacia nilotica* bark. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n.1, p. 20-28, 2009.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SITANSU, P.; DEB, G. *In vitro* bioassay of some plant products against some fungal plant pathogens. **Indian Agriculturist**, v. 41, n. 4, p. 277-285, 1997.
- SMITH, A. H.; IMLAY, J. A.; MACKIE, R. I. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3406-3411, 2003.
- SOLEAS, G. J.; GRASS, L.; JOSEPHY, P. D.; GOLDBERG, D. M.; DIAMANDIS, E. P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 119-124, 2002.
- SOOGARUN, S.; WIWANITKIT, V.; SUWANSUKSRI, J. Inhibition of Heinz body induction of six common Thai medicinal leaves and creeping stems in vitro antioxidant study model. **Acta Horticulturae**, v. 680, p. 161-163, 2005.
- SOTOHY, S. A.; ISMAIL, A.A.; MUELLER, W. Further studies on the antimicrobial properties of some plant materials in relation to their tannin content. **Proceedings of the Third Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Diseases**, v. 1, n. 1-3, 1995.
- SRINIVASAN, K.; RAMASAMY, M.; SHANTHA, R. Tolerance of pulse crops to allelochemicals of tree species. **Indian Journal of Pulses Research**, 1990, v. 3, n. 1, p. 40-44, 1990.
- SRIVASTAVA, S. K.; AGNIHOTRI, V. K. Chemical examination and antibacterial activity of the extracts of *Acacia leucophloea*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 178-179, 1984.
- STRACK, D. Phenolic Metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, p. 387-408, 1997.
- SUNDRIYAL, R. C. Fungitoxic properties of flower extracts of some wild plants of Garhwal Himalaya. **Advances in Plant Sciences**, v. 4, n. 2, p. 230-234, 1991.
- SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

- SUTCLIFFE, J. A. Antibacterial agents: solutions for the evolving problems of resistance. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 23, p. 4159-4161, 2003.
- SWAMINATHAN, C.; RAÍ, R. S. V.; SURESH, K. K. Allelopathic proclivities of *Acacia nilotica* (L) WILLD ex Del. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 2, n. 1, p. 56-60, 1989.
- TEZUKA, Y.; HONDA, K.; BANSKOTA, A. H.; THET, M. M.; KADOTA, S. Kinmoonosides A-C, three new cytotoxic saponins from the fruits of *Acacia concinna*, a medicinal plant collected in Myanmar. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 12, p. 1658-1664, 2000.
- THALANG, V. N.; TRAKOONTIVAKORN, G.; NAKAHARAK, K.; GASSINEE, T. Antioxidant activity of some commonly consumed leafy vegetables in Thailand. **Jircas Journal**, n. 9, p. 35-43, 2001.
- THIRIBHUVAMALA, G.; NARASIMHAN, V. Efficacy of plant extracts on seed-borne pathogen of sunflower. **Madras Agricultural Journal**, v. 85, n. 5-6, p. 227-230, 1998.
- TRIVEDI, L. P.; MODI, N. T.; SARIN, R. K.; RAO, S. S. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on glycosidal fraction of *Acacia farnesiana* (gandh babul). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 1, p. 29-31, 1985.
- \_\_\_\_\_. Bronchodilata and anti-inflammatory effect of glycosidal fraction of *Acacia farnesiana*. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 30, p. 267-268, 1986.
- TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Evaluation of some plant extracts in the management of blue mould rot of mandarin oranges. **Indian Phytopathology**, v. 56, n. 4, p. 481-483, 2003.
- TRIPATHI, B. P.; KHARE, N.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K.; BAINADE, P. S. Performance of medicinal plant leaf extract against *Sclerotium rolfsii* of chickpea. **Environment and Ecology**, v. 24, p. 950-951, 2006.
- TUNG, Y. T.; WU, J. H.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confuse* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p. 1120-1123, 2007.
- TUNG, YU-TANG; WU, JYH-HORNG; HUANG, CHI-CHANG; PENG, HSIANG-CHI; CHEN, YA-LING; YANG, SUH-CHING. Protective effect of *Acacia confusa* bark



extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. **Food & Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1385-1392, 2009.

UNIYAL, S. K.; BAHUGUNA, S.; SATI, O. P. Biological screening of extracts of some medicinal plants from Garhwal. **Herba Hungarica**, v. 29, p. 37-41, 1990.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U. W.; ADSERSER, A.; NYMAN, U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 75-83, 1997.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de nitrogênio, de oxigênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIJAYAKUMAR, R.; MUTHUKUMAR, C.; KUMAR, T.; SARAVANAMUTHU, R. Characterization of *Malassezia furfur* and its control by using plant extracts. **Indian Journal of Dermatology**, v. 51, n. 2, p. 145-148, 2006.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157 : H7. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 49-54, 2004.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; LIMSUWAN, S. Medicinal plant extracts as anti-*Escherichia coli* 0157 : H7 agents and their effects on bacterial cell aggregation. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 10, p. 2336-2341, 2006.

WASSEL, G. M.; EL-WAHAB, S. M.; ABOUTABL, E. A.; AMMAR, N. M.; AFIFI, M. S. Phytochemical examination and biological studies of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd growing in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 1-2, p. 327-340, 1992.

WHITE, E.P. 1943. Alkaloids of the Leguminosae XXVI: examination of further legumes, mainly *Lupinus* and *Acacia* species for alkaloids. **New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 93-162, 1943.

- WHITFIELD, F. B.; SHEA, S. R.; GILLEN, K. J.; SHAW, K. J. Volatile components from the roots of *Acacia pulchella* R.Br. and their effect on *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Australian Journal of Botany**, v. 29, p. 195-208, 1981.
- WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S. Y.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5917-5921, 2005.
- WU, J. H. *et al.* Effect of phytochemicals from the heartwood of *Acacia confusa* on anti-inflammatory mediator production. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1567-1573, 2008.
- YOUNIS, M.; ELMEGEED, G. A.; NASSAR, M. I. Antimicrobial activities of *Acacia ehrenbergiana* extracts and its nitrogen fixation ability. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 195-205, 2003.
- YORBIK, O.; SAYAL, A.; AKAY, C.; AKBIYIK, D.; SOHMEN, T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. **Prostaglandin, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 5, p. 341-343, 2002.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Moderna**. Chapecó: Argos, p. 17-44, 2001.
- ZAPESOCHNAYA, G. G.; KURKIN, V. A.; BRASLAVSKII, V. B.; FILATOVA, N. V. Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 38, n. 4, p. 314-318, 2002.
- ZHOU, B.; JOHNSON, R. K.; MATTERN, M. R.; FISHER, P. W.; KINGSTON, D. G. I. The first naturally occurring Tie2 kinase inhibitor. **Organic Letters**, v. 3, n. 25, p. 4047-4049, 2001.
- ZOU, C.; AGAR, N. S.; JONES, G. L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Sciences**, v. 69, p. 7586, 2001.
- ZUANAZZI, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499-525, 2001.

Fontes virtuais:

\_\_\_\_\_. Disponível em: << <http://www.dalie.com.au/farm/trees.htm> >> Consulta em 14/04/2002.

INTERNATIONAL PLANT NAME INDEX QUERY. Disponível em: <<[http://www.ipni.org/ipni/query\\_ipni.html](http://www.ipni.org/ipni/query_ipni.html)>>. Consulta em 27/10/2005.

PLANTS. NATIONAL PLANTS DATABASE .UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://plants.usda.gov>>. Consulta em 03/04/2003.

## **ANEXOS**

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO BRAZILIAN JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL SCIENCES**

**Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don**

**Cláudia Alexandra de Andrade<sup>1\*</sup>, Ana Luísa Lacava Lordello<sup>2</sup>, Vitor Alberto Kerber<sup>1</sup>,  
Marilis Dallarmi Miguel<sup>1</sup>, Obdúlio Gomes Miguel<sup>1</sup>**

**ABSTRACT:** The extracts and fractions from the flowers of *A. podalyriifolia* were analyzed previously for antibacterial activity using the diffusion in disk and antioxidant properties were evaluated by determining radical scavenging power (DPPH test) and total phenol content measured (the Folin method). The present study describes the *in vitro* antibacterial (determining the minimum inhibitory concentration) and antioxidant activities (by thiobarbituric acid reactive species – TBARS method) for the ethanol extract, dichloromethane and ethyl acetate fractions and two flavanones (naringenine and 5-β-D-glycosyl-naringenine) isolated from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. The flavanones naringenine and 5-β-D-glycosyl-naringenine still had not been obtained from this species. The most effective antibacterial activity were observed in the ethyl acetate fraction (MIC=0.25 mg mL<sup>-1</sup> against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12229, MIC=0.5 mg mL<sup>-1</sup> against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Proteus mirabilis* ATCC 43071). The evaluated samples showed antioxidant activity by TBARS test, especially for ethanol extract (1000 ppm), which was the most active (29.43% ± 0.65) followed by ethyl acetate fraction (1000 ppm, 24.84% ± 1,28), demonstrating both activity higher than the presented by the ascorbic acid (1000 ppm, 21.73% ± 1.77), although lower than the BHT (1000 ppm 35.15% ± 3.42), both reference compounds. Naringenine and 5-β-D-glycosyl-naringenine have demonstrated antioxidant action, but only naringenine has inhibited the growth of gram-positive and gram-negative bacteria.

**Keywords:** *Acacia podalyriifolia*, flavanones, 5-β-D-glycosyl-naringenine, naringenine, antioxidant, antibacterial.

\*Correspondence to:

Obdúlio Gomes Miguel, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail: [obdulio@ufpr.br](mailto:obdulio@ufpr.br)

1 Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil

2 Department of Chemistry, Federal University of Paraná, 81.531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

3 Institute of Technology of Paraná, 81350-010, Curitiba, Paraná, Brazil

## INTRODUCTION

*Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae, is an exotic plant, cultivated in the south of Brazil as an ornamental tree (Burkart, 1979). Several species in the gender *Acacia* present important medicinal applications (Hagos, Samuelsson, 1988; Chhabra *et al.*, 1990; Nabi *et al.*, 1992; Sekine *et al.*, 1997; Kambizi, Afolayan, 2001; Saleem *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Meera *et al.* 2005; Wu *et al.*, 2005) and they possess phenolic compounds, for which countless biological activities are described (Kerber, Silva, 1993; Andrade *et al.*, 2003; Meera *et al.*, 2005). However, until now studies of *A.podalyriifolia* are scarce (White, 1943; Ballandrin *et al.*, 1978; Anderson, Bell, 1976; Churms *et al.*,1970; Andrade *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007), motivating research with this species.

The extracts and fractions from *A. podalyriifolia* were analyzed previously for antibacterial and antioxidant actions and have demonstrated activities. For the evaluation of the antibacterial action, a selection was made against two gram-positive and two gram-negative bacteria, using the diffusion in disk (Andrade *et al.*, 2005). The antioxidant action was verified with the radical free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Andrade *et al.*, 2007).

Previous results in this study have shown that determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), adapted from Brasileiro *et al.* (2006) with modifications, allows estimation of the antibacterial activity quantitatively. For this test, several sequential dilutions of the samples with antibacterial activity were incorporated into the medium, added to the bacterium and incubated for 24 hours. MIC is the smallest concentration of antibacterial agent that is capable of inhibiting the growth of the microorganism *in vitro* (Brasileiro *et al.*, 2006).

Lipid peroxidation, which occurs by increased oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS), is a known mechanism of cellular damage that contributes to aging and many pathological processes such as chronic inflammation, respiratory disorders, neurodegenerative

diseases, diabetes mellitus, atherosclerosis, autoimmune diseases of the endocrine glands and carcinogenesis (Dawn-Linsley *et al.*, 2005; Chanwitheesuk *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007).

Antioxidants are substances that can significantly delay or prevent the oxidation of substrates as well as prevent or repair damage caused to cells by reactive oxygen species (Chanwitheesuk *et al.*, 2005).

TBARS assays measure the end-point oxidative damage, being useful to evaluate the effects of induced oxidative stress and protection from lipid peroxidation by antioxidants which may be present in the analyzed material (Dawn-Linsley *et al.*, 2005).

## **MATERIAL AND METHODS**

Flowers of *A. podalyriifolia* were collected in Curitiba – Brazil, from June to September, 2007. The material was identified for the botanist Gert Hatschbach of the Municipal Botanical Museum of Curitiba and the exsiccate deposited under the number 268.219.

After drying in the shade, 300 g of flowers of *A. podalyriifolia* were submitted to ethanol extraction, followed by partition liquid-liquid with hexane, dichloromethane and ethyl acetate, using Soxhlet, as per methodology described in previous works (Andrade *et al.* 2005, Andrade *et al.* 2007, Carvalho *et al.* 2009). After the evaporation of the solvents under reduced pressure and temperature of 40° C, 0.7 g of dichloromethane fraction and 6.3 g of ethyl acetate fraction were obtained.

The dichloromethane fraction (0.5 g) was submitted to chromatography in a column of silicagel 60 (0.063 to 0.200 mm) Merck® with a mixture of solvents, beginning with hexane, followed by gradually increases polarity (hexane:ethyl acetate and ethyl acetate:methanol). The crystallization obtained among the sub-fractions 19 to 57 (142.2 mg) and subsequent analysis for

thin-layer chromatography (Aluminum Sheet F254 - Merck®) with mobile phase chloroform:methanol (90:10), has demonstrated a mixture of compounds, that were gathered and submitted to chromatographic separation in a column of silicagel 60 (0.063 to 0.200 mm) Merck® with the same sequence of previous solvents. Crystals in yellow needles (15.2 mg), were obtained corresponding to the group of sub-fractions 2 to 4, designated as substance 1.

Also the ethyl acetate fraction (5 g) was submitted to the chromatographic separation in a column of silicagel 60 (0.063 to 0.200 mm) Merck® with a mixture of solvents, beginning with ethyl acetate 100%, followed by gradually increasing polarity (ethyl acetate:formic acid and ethyl acetate:methanol:water:formic acid), yielding crystals in white needles (482 mg), corresponding to the group of sub-fractions 20-33, designated as substance 2.

Substances 1 and 2 were exposed to ultraviolet (200-400 nm) using the reagents diagnoses, according to Mabry *et al.* (1970),  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz CDCl<sub>3</sub>),  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>) and Infrared (400-4000 cm<sup>-1</sup>). Substance 2 hydrolyzed with trifluoroacetic acid 4N (TFA), following thin-layer chromatography (Aluminum Sheet F254 - Merck®) with mobile phase isopropanol:ethyl acetate:nitroethane:water (30:5:5:5), and the monosaccharides standards (glucose, galactose, rhamnose, mannose, xylose) and naringenine, using orcinol 1% in methanol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), with heating, as discloser. For substance 1, thin-layer chromatography has made with authentic sample of naringenine and chloroform: methanol (90:10) as mobile phase.

***Naringenine (1)***: crystals in yellow needles, 3.04% of production in relation to the dichloromethane fraction (0.0071% in relation to the initial material); P.F. 250-252 °C, HRMS (CIMS)  $m/z$ : 294.5 [M + Na]<sup>+</sup> (272.068 made calculations for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>); IR (KBr) 3035-3280 (O-H), 2831-2976 (C-H), 1639 (C=O), 1602 (C=C), 1313-1520 (C-OH), UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 288 (3.92), 320 (sh) (3.58),



(NaOMe) 244 (4.00), 322 (4.18), (NaOAc) 251 (3.43), 320 (4.05), (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 291 (4.06), 320 (3.27), (AlCl<sub>3</sub>) 310 (4.04), 363 (3.20), (AlCl<sub>3</sub> / HCl) 311 (4.11), 371 (3.41) nm (log ε); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz CD<sub>3</sub>OD) δ 2.99 (1H, *dd*, *J* 1.8, 9.6 Hz, H-3α), 3.03 (1 H, *dd*, *J* 9.6, 12.6 Hz, H-3β), 5.24 (1H, *dd*, *J* 1.8, 9.6 Hz, H-2α), 5.81 (2H, *s*, H-6, 8), 6.74 (2H, *d*, *J* 6.5 Hz, H-3', 5'), 7.23 (2H, *d*, *J* 6.5 Hz, H-2', 6'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz CD<sub>3</sub>OD) δ 44.05(C-3), 80.50 (C-2), 96.21 (C-6), 97.09 (C-8), 103.37 (C-10), 116.36 (C-3', C-5'), 129.07 (C-2', C-6'), 131.10 (C-1'), 159.02 (C-4'), 165.47 (C-5), 168.39 (C-7), 164.90 (C-9), 197.81 (C-4).

**5-β-D-glycosyl-naringenine (2):** crystals in white needles, 9.64% of production in relation to the ethyl acetate fraction (0.2% in relation to the initial; P.F 172-173 °C; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> - 121° (*c* 1.3, MeOH); HRMS (CIMS) *m/z*: 457.1187 [M.+ Na]<sup>+</sup> (434.1213 made calculation for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>); IR (KBr) 3362(O-H), 2891-2978 (C-H), 1685 (C=O), 1585-1646 (C=C), 1458-1531 (C-OH), UV λ<sub>max</sub> (MeOH): 283 (4,11), 320 (sh) (3.78), (NaOMe): 249 (4.02), 325 (4.31); (NaOAc): 252 (4.02), 325 (4.31); (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>): 283 (4.15), 321 (sh) (3.88); (AlCl<sub>3</sub>): 226 (4.36), 283 (4.15), 320 (sh) (3.83); (AlCl<sub>3</sub>/HCl): 226 (4.34), 283 (4.11), 320 (sh) (3.81); nm (log ε); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz CD<sub>3</sub>OD) δ 2.56 (1H, *dd*, *J* 2.7, 17.10 Hz, H-3α), 2.99 (1 H, *dd*, *J* 12.9, 17.10 Hz, H-3β), 3.47 a 3.53 (4H of the glucose, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5''), 3.71 (1H, *d*, *J* 7.2 Hz, H-6''α), 3.73 (1H, *d*, *J* 7.2 Hz, H-6''β), 4.67 (1H, *d*, *J* 7.5 Hz, H-1''), 5.33 (1H, *dd*, *J* 2.7, 12.9 Hz, H-2α), 6.06 (1H, *d*, *J* 2.1 Hz, H-6), 6.37 (1H, *d*, *J* 2.1 Hz, H-8), 6.75 (2H, *dd*, *J* 2.7, 8.4 Hz, H-3', 5'), 7.26 (2H, *dd*, *J* 6.0, 8.7 Hz, H-2', 6'); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz CD<sub>3</sub>OD) δ 44.51(C-3), 60.69 (C-6''), 69.61 (C-4''), 73.47 (C-2''), 75.57 (C-5''), 77.57 (C-3''), 78.16 (C-2), 97.78 (C-8), 98.96 (C-6), 103.49 (C-1''), 105.38 (C-10), 115.15 (C-3', C-5'), 128.33 (C-2', C-6'), 128.98 (C-1'), 157.69 (C-4'), 160.74 (C-5), 164.24 (C-7), 165.14 (C-9), 190.10 (C-4).

**Antioxidant Activity:** The samples obtained from the flowers of *Acacia podalyriifolia* (ethanol extract, the dichloromethane and ethyl acetate fractions and the isolated substances naringenin and 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenin) were submitted to the antioxidant test thiobarbituric acid reactive species, using concentrations of 100, 500 and 1000 ppm (parts per million), according to Morais *et al.* (2006) with modifications. Ascorbic acid and BHT (butylated hydroxy toluene) were used as reference compounds. The whole procedure was performed in triplicate.

In test tubes were added 0.5 mL of egg yolk solution (10% w/v), 0.1 mL of each sample or reference compound and the volume was completed to 1 mL with distilled water. It was then added to each one of the test tube 0.05 mL of solution of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride - AAPH (0.07 mol/L), 1.5 mL of acetic acid 20% (pH 3.5) and 1.5 mL of thiobarbituric acid - TBA (0.8% w/v) in solution of sodium dodecil sulfate - SDS (1.1% w/v). The material thus prepared was subjected to water bath (95 C) for 1 hour, stirring. After cooling, were added to each tube 5 mL of n-butanol, centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and the supernatants measured by spectrophotometer (Shimadzu) at 532 nm. The same process was carried out with control tubes in which were added to all reagents except the samples.

The antioxidant activity was determined by Antioxidant Index (AI) obtained as a percentage, according to the equation:  $AI (\%) = 1 - (A/C) \times 100$ , where *A* is the absorbance of the sample and *C* is the absorbance of control fully oxidized. Results are expressed as mean and standard deviation. The statistical examination of the data was performed using the R Project for Statistical Computing (Gnu Operating System, 2010). Mean values were compared by using analysis of the variance (ANOVA) test and differences between means were detected by using Tukey test ( $p < 0.05$ ).

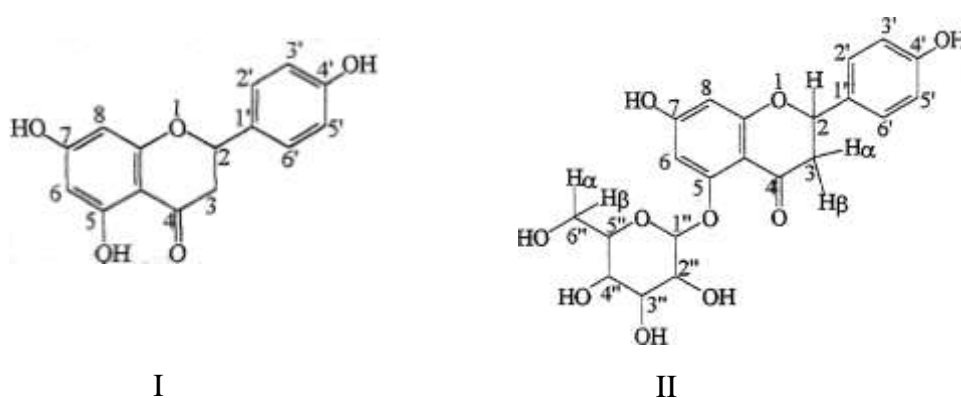
**Antibacterial Activity:** The antibacterial action was made by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), according to Brasileiro *et al.* (2006) with modifications. The gram -

positive strains used were *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12229) and *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) and strains gram-negative used were *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), all acquired by Newprov® in lyophilized disk. The bacterial suspensions were adjusted, using a sterile solution of sodium chloride 0.9%, to conform to the turbidity standard 0.5 of the Mac Farland scale ( $10^8$  CFC mL<sup>-1</sup>), according to National Committee For Clinical Laboratory Standards (1997). A 0.1 mL aliquot of bacterial suspension containing  $10^8$  CFC mL<sup>-1</sup> was mixed with 100 mL of sterilized solution of Tween 80 (2%) and this mixture was then used in the assay. A sequential dilution of the samples was used (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 and 0.075 mg mL<sup>-1</sup>) and added in test tubes containing 1 mL of the TSB (Tryptic Soybean Broth). After that, 1 mL of bacterial suspension, which was, in turn, previously adjusted, was then applied to each tube. The tube negative control contained only the microorganisms without the samples, while the positive control contained the microorganisms and chloramphenicol (2 mg mL<sup>-1</sup>). All the process was repeated twice. The material was incubated to 37°C for 24 hours. The minimum inhibitory concentration was defined as the smallest concentration where no microbial development occurs, verified by absence of turbidity in the tube with the sample.

## RESULTS AND DISCUSSION

With the dichloromethane fraction submitted to the silicagel column chromatography 15.2 mg of crystals were obtained in the form of needles that show yellow coloration (substance 1), while the ethyl acetate fraction produced 482 mg of crystals in form of needles of white coloration (substance 2).

The structures of the isolated substances were determined using classic spectroscopic methods (UV,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IR and mass spectrometric), analytical thin-layer chromatography with standards and comparisons to the literature (Mabry *et al.*, 1970; Agrawal, 1992; Kerber, Silva, 1993; Saito *et al.*, 1994; Ogundaini *et al.*, 1996; Zapesochnaya *et al.*, 2002; Morimura *et al.*, 2006), which identified substance 1 as naringenine and substance 2 as 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenine (Figure 1).



**FIGURE 1** - Chemical structure of naringenine (I) and 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenine (II)

These compounds had not previously been isolated from *Acacia podalyriifolia*, but its presence had already been noted in the flowers of *Acacia longifolia* (KERBER, SILVA, 1993).

The evaluated samples obtained from the flowers of *A. podalyriifolia* showed antioxidant activity by TBARS test, especially for ethanol extract (1000 ppm), which was the most active, followed by ethyl acetate fraction (1000 ppm), demonstrating both activity higher than the presented by reference compounds, the ascorbic acid (1000 ppm), although lower than the BHT (1000 ppm). Both isolated substances also showed activity, albeit less intense than those reported by their original fractions (Table I).

**Table I** - Antioxidant Index (%), obtained by TBARS test, of reference compounds and extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don

Concentration sample	1000 ppm			500 ppm			100 ppm		
	AI	SD		AI	SD		AI	SD	
BHT	35,15	3,42	ac	20,25	1,07	bc	10,73	0,59	cab
Ascorbic acid	21,73	1,77	af	14,87	1,44	bd	3,67	0,70	cdef
Ethanol extract	29,43	0,65	acde	18,05	2,01	bcd	13,07	1,91	ca
Ethyl acetate fraction	24,84	1,28	aef	16,45	1,73	bcd	5,98	1,38	ccde
Dichloromethane fraction	19,75	2,31	afg	7,60	1,42	bf	4,55	1,60	ccde
Naringenine	14,60	2,42	ag	8,60	1,31	bef	0,00	0,00	cf
5-β-D-glycosyl naringenine	27,74	2,50	ade	14,19	2,02	bd	1,63	1,55	cef

NOTE: AI = antioxidant index (%), data present mean of three experiments with medium values; SD = standard deviation. Differences between means indicated by the same letters are not statistically significant (Tukey test,  $p < 0.05$ ).

For the antibacterial activity, absence of turbidity in the test tubes containing TSB, sample and appraised bacterium, indicates that the sample material, in the given concentration, show an inhibitory effect for the growth of strains. As demonstrated in Table II, the ethanolic extract and the dichloromethane fraction became only slightly active, demonstrating inhibition to the strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with MIC of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . The ethyl acetate fraction inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with MIC of  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ , *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* with MIC of  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . For isolated substances, there was inhibitory effect only with naringenine (MIC of  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* and

*Proteus mirabilis*. 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenine caused no inhibitory effect in the given concentrations.

**TABLE II** – Antibacterial activity, by determining of the MIC, of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don

SAMPLES (1)	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )							
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhimurium</i>
EE	1	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2
DCMF	1	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2
EAF	0.25	0.25	0.5	>2	0.5	>2	0.5	>2
NAR	2	2	>2	>2	2	>2	2	>2
NARGLY	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2

NOTE: N = absence of inhibition, EE = ethanolic extract, DCMF = dichloromethane fraction, EAF = ethyl acetate fraction, NAR = naringenine and NARGLY = 5- $\beta$ -D-glycosyl naringenine, MIC = the minimum inhibitory concentration, the smallest concentration where no microbial development occurs, verified by absence of turbidity in the tube with the sample.

The results obtained with these tests have demonstrated the ethyl acetate fraction is more active. Although the flavanone 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenine, was the substance isolated in greater abundance from this fraction, has demonstrated antioxidant action, it didn't show any activity against the tested bacteria. It is possible that the presence of flavonoids and phenolic compounds in the ethyl acetate fraction, as demonstrated in the phytochemistry studies carried out by Andrade *et*

*al.* (2003) or a possible synergism among these, could be responsible for the biological effects observed with these samples.

The amount of flavonoids 5- $\beta$ -D-glycosyl-naringenine and naringenine in the flowers of *A. podalyriifolia* (2000  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 71  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively) is considerable. There are a great number of studies that detail the pharmacological properties of these compounds. Among the several applications of these flavanones are an antioxidant effect (Acker, 2000), hepatoprotector effect (Lee *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2007), anti-inflammatory (Bodet *et al.* 2008), antiviral (Paredes *et al.* 2003; Nahmias *et al.*, 2008), antihypertensive (Saponara *et al.*, 2006) and antimutagenic (Choi *et al.*, 1994; Renugadevi, Prabu, 2009). Such studies demonstrate the many potential applications of these compounds, with *A. podalyriifolia* an important source of these substances.

Further investigation of the ethyl acetate fraction, extracted from the flowers from *A. podalyriifolia* may yield further discoveries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Gert Hatschbach of the Municipal Botanical Museum of Curitiba (MBM) for the identification of the species and Sandro R. Dias and Keith Wollis for the collaboration in the translation.

## REFERENCES

- ACKER, F.V. Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. *Febs Lett*, v. 473, n. 2, p. 45-148, 2000.
- AGRAWAL, P.K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.

ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C. Studies of uronic acid materials: Part 49. Partial structural studies of four *Acacia* gums exudates of the series Phyllodineae. *Phytochemistry*, v. 15, n. 2, p. 301-303, 1976.

ANDRADE, C.A.; SILVA, V.C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* – atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. *Visão Acadêmica*, v.4, n.1, p. 47-56, 2003.

ANDRADE, C.A.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; CARVALHO, J.L.S.; ABRAHAO, W.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. *Rev Bras Farmacogn*, v. 15, n. 1, p. 13-15, 2005.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. *Rev Bras Farmacogn*, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; SMOLENSKI, S.J.; DOBBERSTEIN, R.H. Reverse-phase High-Pressure Liquid Chromatography of some tryptamine derivatives. *J Chromatogr*, v. 157, sep 21, p. 365-370, 1978.

BODET, C.; LA, V.D.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 4, p. 400-407, 2008.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZILO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Cien Farm*, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.



BURKART, A. Leguminosas - Mimosoideas. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: P. Raulino Reitz, v. 1, p.17-48, 1979.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O. G. Term-stability of extractive processes from *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae for Soxhlet modified system. *Quim Nova*, vol. 32, n. 4, p.1031-1035, 2009.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. A. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem*, v. 92, p. 491-497, 2005.

CHHABRA, S.C.; UIISO, F.C. A survey of medicine plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. *Fitoterapia*, v. 4, n. 61, p.307-316, 1990.

CHOI, J.S.; PARK, K.Y.; MOON, S.H.; RHEE, S.H.; YOUNG, H.S. Antimutagenic effects of plant flavonoids in the Salmonella assay system. *Arch Pharm Res*, v. 17, n. 2, p. 71-5, 1994.

CHURMS, S.C.; STEPHEN, A.M. Acid hydrolysis of the polysaccharide gum from *Acacia podalyriaefolia*: molecular-weight distribution studies. *Carbohydr Res*, v. 15, n. 1, p. 11-19, 1970.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *J Neurosci Meth* v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.

GNU OPERATION SYSTEM. **R Project for statistical computing**. Disponível em: <http://www.r-project.org> > acesso em: 12 de março de 2010.

HAGOS, M.; SAMUELSSON, G. Quantitative determination of Quercetin A, B and (+)-fisetinidin in bark and gum of *Acacia tortilis*. *Acta Pharm Suec*, v. 25, n. 6, p. 321-324, 1988.

- KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A.J. An ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted disease (njovera) in Guruve District, Zimbabwe. *J Ethnopharmacol*, v. 77, n.1, p. 5-9, 2001.
- KERBER, V.A.; SILVA, G.A.A.B. Flavonóides da *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. - Leguminosae-Mimosoideae. *Rev Bras Farm*, v. 74, n.1, p 16-18, 1993.
- LEE, M.H.; YOON, S.K.; MOON, J.O.K. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine – induced liver damage in rats. *Biol Pharm Bull*, v. 27, n. 1, p. 72-76, 2004.
- MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag, p. 35-279, 1970.
- MEERA, B.; CHANDER, J.; KALIDHAR, S. B. A review on the chemistry and bioactivity of the *Acacia* spp. *J Med Aromatic Plant Sci*, v. 27, p. 51-90, 2005.
- MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. *Quím. Nova*, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MORIMURA, K. I.; GATAYAMA, A.; TSUKIMATA, R.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; HIRATA, E.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M.; TAKEDA, Y. 5-O-Glucosyldihydroflavones from the flowers of *Helicia cochinchinensis*. *Phytochemistry*, v. 67, n. 24, p. 2681-2685, 2006.
- NABI, A.B.D.; REISINGER, E.C.; REINTHALER, F.F.; STILL, F.; EIBEL, U.; KREJS, G. J. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *nilotica* (Mimosaceae). *J Ethnopharmacol*, v. 37, n. 1, p. 77-79, 1992.
- NAHMIA, Y.; GOLDWASSER, J.; CASALI, M.; POLL, D.V.; WAKITA, T.; CHUNG, R. T.; YARMUSH, M. L. Apolipoprotein  $\beta$ -dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, v. 47, n. 5, p. 1437-1445, 2008.

- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 4 th edn. M7-A4. Wayne. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- OGUNDAINI, A.; FARAH, M.; PERERA, P.; SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. Isolation of two new antiinflammatory biflavanoids from *Sarcophyte piriei*. *J Nat Prod*, v. 59, n. 6, p. 587-590, 1996.
- PAREDES, A.; ALZURU, M.; MENDEZ, J.; ORTEGA, M.R. 2003. Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biol Pharm Bull*, v. 26, n. 11, p. 108-109, 2003.
- RENUGADEVI, J.; PRABU, M. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, v. 256, n. 4, p. 128-134, 2009.
- SAITO, N.; CHENG, J.; ICHIMURA, M.; YOKOI, M.; ABE, Y.; HONDA, T. Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 3, p. 687-691, 1994.
- SALGADO, S.C.; ANDRADE, R.R.; CRESPO, F.A.; GALICIA, J.V.; RIVERA, I.L.; MONTES, S.; MOLINA, R.V.; SOTO, S.E. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. *J Ethnopharmacol*, v. 109, n. 3, p. 400-405, 2007.
- SALEEM, A.; AHOTUPA, M.; PIHLAYA, K. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. *Z Naturforsch*, v. 56, n. 11-12, p. 973-978, 2001.
- SAPONARA, S.; TESTAI, L.; LOZZI, D.; MARTINOTTI, E.; MARTELLI, A.; CHERICONI, S.; SGARAGLI, G.; FUSA, F.; CALDERONE, V. (+/-) Naringenin as large conductance  $Ca^{+2}$  activated  $K^{+}$  ( $BK_{ca}$ ) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, v. 149, n. 8, p. 1013-1021, 2006.

SEKINE, T.; FUKASAWA, N.; IKEGAMI, F.; SAITO, K.; FUJII, Y.; MURAKOSHI, I. Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxiamide from the seeds of the Thai medicinal plant *Acacia concinna*. *Chem Pharm Bull*, v. 45, n. 1, p. 148-151, 1997.

WHITE, E.P. 1943. Alkaloids of the Leguminosae XXVI: examination of further legumes, mainly *Lupinus* and *Acacia* species for alkaloids. *New Zeal J Sci Technol*, v. 25, n. 3, p. 93-162, 1943.

WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S.Y.; SHYUR, L.F.; KUO, Y.H; CHANG, S.T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J Agric Food Chem*, v. 53, n. 15, p. 5917-5921, 2005.

ZAPESOCHNAYA, G.G.; KURKIN, V.A.; BRASLAVSKII, V.B.; FILATOVA, N.V. Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chem Nat Compd*, v. 38, n. 4, p. 314-318, 2002.

**ARTIGOS PUBLICADOS NO BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY**

1. ANDRADE, C. A.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; CARVALHO, J. L. S.; ABRAHAO, W. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 1, p. 13-15, 2005.
2. ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.



## Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae

C.A. Andrade, C. Peitz, M. Cúnico, J.L.S. Carvalho, W.M. Abrahão, O.G. Miguel, M.D. Miguel, V.A. Kerber\*

*Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Av. Lothário Meissner 3400, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil*

**RESUMO:** A atividade antibacteriana das flores da *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. (Leguminosae) foi avaliada pelo método de difusão em disco. As bactérias testadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O meio de cultura utilizado foi ágar Müeller-Hinton. Foram utilizados discos de papel (6 mm de diâmetro) impregnados com 1000, 500, 250 e 125 µg dos extratos: Etanol Bruto, fração Acetato de Etila e fração Diclorometano obtidas a partir do extrato etanólico bruto. Os resultados indicam que as amostras avaliadas exercem ação contra as cepas gram positivo testadas, em graus variáveis sendo que a fração Acetato de Etila apresentou maior atividade. A triagem fitoquímica indicou a presença de fenóis e flavonoides nas flores de *A. podalyriifolia*.

**Unitermos:** *Acacia podalyriifolia*, atividade antibacteriana.

**ABSTRACT:** "Evaluation of the antibacterial activity and phytochemical screening of the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae". The antibacterial activity of the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. (Leguminosae) was evaluated through the gel diffusion method. The bacteria tested were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Escherichia coli* (ATCC 11229) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The culture media was agar Müeller-Hinton. Paper discs (6 mm in diameter) with 1000, 500, 250 and 125 µg of the tested extracts (crude ethanolic and its fractions; Ethyl Acetate and Dichloromethane) were used. The results indicated action against the gram-positive tested strains in different levels. The Ethyl Acetate extract showed a higher activity. Phenols and flavonoids were detected in the flowers of *A. podalyriifolia* through phytochemical screening.

**Keywords:** *Acacia podalyriifolia*, antibacterial activity.

### INTRODUÇÃO

Também conhecida como Acacia-mimosa, *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. (Leguminosae) é uma planta exótica, originária da Austrália, vastamente difundida no sul do Brasil pelo cultivo como planta ornamental (Burkart, 1979). Apresenta-se como árvore pequena, atingindo no máximo 5 metros de altura.

Tradicionalmente são empregadas diferentes espécies de *Acacia* no tratamento das mais diversas patologias (Andrade et al., 2003). Dentre as atividades encontradas no gênero, tem havido vários relatos sobre atividade antibacteriana porém nenhuma citação para a espécie em estudo. Desta forma, o presente trabalho objetivou verificar o efeito dos extratos das flores desta planta sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC

1228), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material vegetal

Flores da *A. podalyriifolia* A. Cunn. foram coletadas em Curitiba, entre os meses de Junho e Agosto de 2002. O material foi identificado pelo botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba e uma amostra foi herbarizada no mesmo local sob o número 268.219.

#### Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada no extrato

\*E-mail: kerber@ufpr.br, Tel. + 55-41-3604107



**Tabela 1.** Inibição do crescimento bacteriano com extrato etanólico bruto (EEB), fração diclorometano de EEB (FDCM) e a fração acetato de etila de EEB (FAE) de *A. podalyriifolia*

Extrato/Fração	Dose ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )	Zona de inibição de crescimento (mm de diâmetro)			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EEB	1000	9	21	–	–
	500	–	15	–	–
	250	–	–	–	–
	125	–	–	–	–
FDCM	1000	–	10	–	–
	500	–	–	–	–
	250	–	–	–	–
	125	–	–	–	–
FAE	1000	13	24	–	–
	500	11	20	–	–
	250	–	16	–	–
	125	–	7	–	–

etanólicobruo e nas frações obtidas por partição, conforme descrito no item “Preparo dos Extratos Vegetais”. Os reativos utilizados foram descritos por Moreira (1979). Os grupos químicos testados foram: antocianos, saponinas, leucoantocianos, fenóis, flavonóides, taninos, antraquinonas, cumarinas, alcalóides e triterpenos/esteróides.

#### Preparo dos extratos vegetais

Flores secas (150 g) de *A. podalyriifolia* foram extraídas com etanol em ebulição sob refluxo (5 vezes de 20 min. cada). O material foi filtrado e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura de até 50 °C, até um volume final de 100 mL o qual foi mantido em geladeira por 15 h (durante a noite) e então centrifugado. O resíduo foi desprezado, obtendo-se o Extrato Etanólico Bruto (EEB). A 50 mL de EEB foram adicionados 100 ml de água destilada. O extrato hidroalcoólico resultante (150 mL) foi desengordurado por partição com n-hexano em funil de separação até a fase hexânica apresentar-se incolor. A fase hidroalcoólica resultante do processo anterior foi, então, particionada com diclorometano em funil de separação até que a fase diclorometano se apresentasse incolor, resultando na Fração DiCloroMetano (FDCM). Em seguida procedeu-se o particionamento da fase hidroalcoólica remanescente com acetato de etila em funil de separação, até que a fase acetato de etila se apresentasse incolor, resultando na Fração Acetato de Etila (FAE) (Kerber; Silva, 1993).

#### Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e frações das flores de *A. podalyriifolia* foi utilizado o método da difusão em gel (Smânia et al., 1995; Ulubelen et al., 2000).

O Extrato etanólico bruto (EEB), a fração

diclorometano (FDCM) e a fração acetato de etila (FAE) foram esterilizados por filtração através de membranas (Millex®), com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e adicionados em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro estéreis, nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125  $\mu\text{g}/\text{disco}$ .

A atividade inibitória do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foi verificada pela formação de halo de inibição do crescimento ao redor dos discos.

Foram utilizados, um disco de cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ) como controle positivo de inibição e discos impregnados com os solventes, como controle de inibição dos solventes. Todos os testes foram realizados em triplicata e a incubação foi de 24 h a 35 °C.

#### RESULTADOS

A triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto (EEB) das flores de *A. podalyriifolia* e de suas frações diclorometano (FDCM) e Acetato de Etila (FAE) indicou a presença de fenóis e flavonóides em todo o material testado. Os dados relativos à formação de halo de inibição de crescimento das cepas testadas frente as diferentes concentrações dos extrativos vegetais utilizados estão descritos na tabela 1.

#### DISCUSSÃO

Na avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto das flores de *A. podalyriifolia* e de suas frações ficou demonstrado o potencial antibacteriano dos mesmos sobre as cepas gram positivo (*S. aureus* e *S. epidermidis*). O mesmo não foi evidenciado com as cepas gram negativo (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Compostos flavonóides foram relacionados à atividade antibacteriana de *Ocimum basilicum* (Anton,

1988) e de *Psidium guajava* (Grovesnor; Supriono; Gray, 1995). Como foi verificada a presença de compostos flavonoidicos nos extratos testados os mesmos podem também estar envolvidos na atividade encontrada. Embora, dentre as cepas testadas, a maior atividade foi verificada contra *S. epidermidis*, bactéria não nociva, ao homem, também foi verificada atividade contra *S. aureus*, em menor intensidade. Este resultado indica a necessidade de estudos futuros com um maior número de cepas bacterianas e também com uma variedade maior de bactérias. O fato de ter sido verificado atividade com apenas 125 µg/disco para uma fração de extrato onde existe uma grande quantidade de substâncias, corrobora o forte potencial antibacteriano uma vez que o antibiótico de referência (cloranfenicol) é usado de forma pura na concentração de 30 µg/disco.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

#### REFERÊNCIAS

- Andrade CA, Peitz C, Silva VC, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA 2003. Revisão do gênero *Acácia* – Atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. *Visão Acadêmica* 4: 47-56.
- Anton R 1988. Flavonoids and tradicional medicine. In: Cody E, Harborne JR, Beretz A (Orgs.) *Plant flavonoids in biology and medicine II. Progress in clinical and biological research*, 280, Allan R. Liss, New York, 423-439, *apud* Grovesnor PW, Supriono A, Gray DO 1995. Medicinal Plants from Riau Province, Sumatra, Indonésia. Part. 2: antibacterial and antifungal activity. *J Ethnopharmacol* 45: 97-111.
- Burkart A. 1979. *Flora ilustrada catarinense. As Plantas Leguminosas Mimosoideas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Grovesnor PW, Supriono A, Gray DO 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonésia. Part. 2: antibacterial and antifungal activity. *J Ethnopharmacol* 45: 97-111.
- Kerber VA, Silva GAAB 1993. Flavonoides de *Acacia longifolia* (Andr) Willd-Leguminosae-Mimosoidae. *Rev Bras Farm* 74: 16-18.
- Moreira EA 1979. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeladii* R. Braga. Campanulaceae. *Tribuna Farmacêutica* 5: 13-39.
- Smânia AJr, Delle Monache F, Smania EFA, Gil ML, Bencherit LC, Cruz FS 1995. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J Ethnopharmacol* 45: 177-181.
- Ulubelen A, Öksüz S, Bozok-Johansson C, Celik C, Voelter W 2000. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. *Planta Med* 66: 458-462.





## Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae

Cláudia Alexandra de Andrade<sup>1</sup>, Camila Klocker Costa<sup>1</sup>, Karina Bora<sup>1</sup>, Marilis Dallarmi Miguel<sup>2</sup>, Obdulio Gomes Miguel<sup>1</sup>, Vitor Alberto Kerber<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothario Meissner, 3400, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothario Meissner, 3400, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil

**RESUMO:** Espécies de *Acacia* são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diversas patologias. Estudos quimiotaxonômicos têm relacionado o gênero *Acacia* como fonte de compostos fenólicos, os quais apresentam propriedades biológicas diversas. Este trabalho destaca a atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia*. Esta planta é originária da Austrália e amplamente cultivada no Sul do Brasil como ornamental. O material vegetal (flores) foi seco à sombra, submetido à extração com etanol, seguido de partição com hexano, diclorometano e acetato de etila. A triagem fitoquímica realizada no extrato etanólico bruto e nas suas frações, demonstrou a presença de compostos fenólicos e flavonóides. A determinação do conteúdo fenólico foi realizada com o reativo Folin Ciocalteu, verificando ser a fração acetato de etila (FAE) a que apresentou a maior concentração (338,5 mg de ácido gálico/g de FAE). Na avaliação da atividade captadora de radical, empregando o radical livre DPPH, a fração acetato de etila demonstrou atividade antioxidante mais elevada (IC<sub>50</sub> = 3,22 µg/mL de FAE).

**Unitermos:** *Acacia podalyriifolia*, antioxidante, compostos fenólicos.

**ABSTRACT:** "Determination of the phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae". *Acacia* species are usually used as treatment for several diseases. Chemotaxonomic studies have related the *Acacia* genus as a source of phenolic compounds, which present several biological properties. This work emphasizes the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia*. This plant is natural from Australia and vastly cultivated in the South of Brazil as ornamental feature. The plant material (flowers) was shadow-dried and submitted to the extraction with ethanol, followed by partition with hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The phytochemical screening performed in the ethanol crude extract and in its fractions showed the presence of phenolic compounds and flavonoids. Determination of the phenolic content was performed with the Folin Ciocalteu reagent. It was found out that the ethyl acetate fraction (FAE) was the one that displayed the biggest concentration (338.5 mg of gallic acid/g of FAE). In the evaluation of the radical scavenging activity, using the free radical DPPH, the ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 3.22 µg/mL from FAE).

**Keywords:** *Acacia podalyriifolia*, antioxidant, phenolic compounds.

### INTRODUÇÃO

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo "espécies reativas de oxigênio" (ERO) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxila (HO·), o radical peroxila (ROO·) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou

por fatores exógenos (Gyamfi et al., 1999; Gülçin et al., 2003).

Estas espécies reativas de oxigênio podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese

\* E-mail: kerber@ufpr.br, Tel. +55-41-33604066

(Gyamfi et al., 1999; Al-Mamary et al., 2002; Gülcin et al., 2003; Chanwitheesuk et al., 2005).

Antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia (Al-Mamary et al., 2002; Moreira et al., 2002; Chanwitheesuk et al., 2005; Wu et al., 2005; Lima et al., 2006), além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (Chanwitheesuk et al., 2005).

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonóides e ácidos fenólicos, apresentam destaque especial como antioxidantes, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de reduzirem e quelarem ions férrico que catalisam a peroxidação lipídica (Al-Mamary et al., 2002; Nahar; Sarkar, 2005; Delazar et al., 2006).

Estudos quimiotaxonômicos relacionam o gênero *Acacia* como reconhecida fonte de substâncias fenólicas (Kerber; Silva, 1993; Andrade et al., 2003; Pansera et al., 2003), os quais apresentam uma grande variedade de ações biológicas (Duroux et al., 1998; Peitz et al., 2003), dentre elas a atividade antioxidante.

Estudos etnobotânicos revelaram que diferentes espécies de *Acacia* têm sido empregadas no tratamento das mais diversas patologias (Hagos; Samuelsson, 1988; Chhabra et al., 1990; Nabi et al., 1992; Sekine et al., 1997; Kambizi; Afolayan, 2001; Wu et al., 2005).

Ação antioxidante foi observada em diferentes espécies do gênero *Acacia*. Extratos de *A. catechu* (Park; Boo, 1991; Naik et al., 2003), *A. confusa* (Chang et al., 2001; Wu et al., 2005); *A. nilotica* (Saleem et al., 2001) e *A. pennata* (Thalang et al., 2001) apresentavam efeitos antioxidantes devido à presença de substâncias polifenólicas, como flavonóides e taninos. Mel obtido de *A. ehrenbergina* (Al-Mamary et al., 2002) e de outras espécies de *Acacia* (Meda et al., 2005), apresentou elevado potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos. Extratos e compostos flavonoidicos obtidos de *A. mangium* e *A. auriculiformis* também demonstraram intensa atividade captadora de radicais livres (Mihara et al., 2005).

Também conhecida como Acacia-minosa, *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae, é uma planta exótica, originária da Austrália, amplamente difundida no sul do Brasil pelo cultivo como árvore ornamental (Burkart, 1979; Duarte, Wolf, 2005).

Os trabalhos fitoquímicos descritos para *Acacia podalyriifolia* foram realizados com as folhas, goma e flores desta espécie. Alcalóides foram obtidos por White (1943) e por Balandrin et al. (1978) a partir do extrato etanólico das folhas. Polissacarídeos da goma foram analisados por Anderson & Bell (1976) e por Churms et al. (1977). Substâncias fenólicas flavonoidicas foram obtidas do fracionamento do extrato etanólico das flores por Andrade et al. (2005).

O interesse no potencial antioxidante de *Acacia podalyriifolia* foi reforçado pela presença de substâncias fenólicas flavonoidicas nas suas flores e por não haver relato na literatura destes estudos para esta espécie (Andrade et al., 2005).

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) um dos mais utilizados (Arnao et al., 2000). O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intensa (Blois, 1958; Arnao et al., 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert e Beer, podendo ser medida espectrometricamente a 517 nm (Blois, 1958).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Flores de *A. podalyriifolia* foram coletadas em Curitiba, entre os meses de junho a setembro de 2004. O material foi identificado pelo botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba e sua exsiccata encontra-se depositada no mesmo local sob o número 268.219.

### Preparo dos extratos vegetais

Após secagem à sombra, flores de *A. podalyriifolia* foram submetidas à extração com etanol, seguida de partição líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila, segundo metodologia descrita por Kerber & Silva (1993) e Andrade et al. (2005), obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB), as frações diclorometano (FDCM) e acetato de etila (FAE). Aliquotas de EEB, FDCM e FAE foram conduzidas à secura, em evaporador rotatório sob pressão reduzida e então dissolvidas em etanol, para serem utilizadas na determinação do conteúdo de compostos fenólicos e nos testes de atividade antioxidante.

### Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato etanólico bruto (EEB) e nas frações diclorometano (FDCM) e acetato de etila (FAE) foi realizado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Kujala et al., 2000; Wu et al., 2005; Meda et al., 2005), com algumas modificações.



Aliquotas de EEB, FDCM e FAE foram diluídas com água destilada para se obter concentrações de 25 a 125 µg/mL. A 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2 N e 1,0 mL de água. Após um período de 2 a 5 minutos, foi acrescentado aos tubos 0,5 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 10%. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 760 nm, usando água destilada como branco. Ácido gálico (2,5 a 12,5 µg/mL), dissolvido em água destilada, foi usado para elaboração da curva de concentração padrão e os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra).

#### Avaliação da atividade antioxidante

A ação antioxidante da *Acacia podalyriifolia* foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes na amostra captarem o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), conforme as metodologias descritas por Gyamfi et al. (1999), Meda et al. (2005) e Wu et al. (2005), com algumas modificações.

Para a avaliação da atividade captadora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), alíquotas de EEB, FDCM e FAE (amostras), ácido ascórbico e rutina (padrões) foram diluídas com etanol para se obter as concentrações de 0,5 a 100 µg/mL. A 3 mL de cada amostra foi acrescentado 0,1 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 1 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 517 nm, contra um branco específico em cada avaliação, formado somente pelas amostras nas suas respectivas diluições. Como controle, foi utilizado 0,1 mL de solução etanólica de DPPH 1 mM e 3 mL de etanol.

Para avaliar a atividade captadora de radical, foi obtida a porcentagem de inibição, conforme a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = [(Absorbância \text{ do controle} - absorbância \text{ da amostra}) / absorbância \text{ do controle}] \times 100$$

A determinação da IC<sub>50</sub>, ou seja, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH, foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes. Para detectar as diferenças entre as médias e avaliar estas diferenças foi utilizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

## RESULTADOS

### Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos (mg de ácido gálico/g de amostra) foi de 206,4 para o extrato etanólico bruto (EEB), 240,2 para a fração diclorometano (FDCM) e 338,5 para a fração acetato de etila (FAE), usando a curva padrão do ácido gálico (R<sup>2</sup> = 0,9945).

### Avaliação da atividade antioxidante

A porcentagem de inibição do radical DPPH (% inibição), para as amostras e padrões (0,50 a 100 µg/mL) está representada no Gráfico 1. Os valores médios de concentração das amostras (EEB, FDCM e FAE) e dos padrões (ácido ascórbico e rutina), que causam 50% de inibição do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) estão representados na Tabela 1. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. O valor de IC<sub>50</sub> de 3,22 µg/mL obtido para a fração acetato de etila foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos obtidos para o padrão de ácido ascórbico (0,49), para o extrato etanólico bruto (10,48) e para a fração diclorometano (36,65), mas não difere estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do apresentado pelo padrão de rutina (4,14).

## DISCUSSÃO

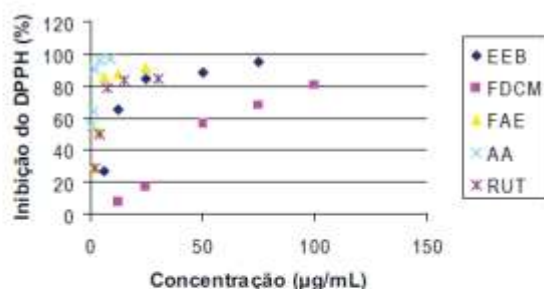
Muitas substâncias naturais, obtidas das plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas (Gülcin et al., 2003).

As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como eficientes captadores radiculares, como demonstrado por Gyamfi et al. (1999), Kujala et al. (2000), Chang et al. (2001), Sallem et al. (2001), Thalang et al. (2001), Al-Mamary et al. (2002), Mihara et al. (2005), Meda et al. (2005), Wu et al. (2005).

O gênero *Acacia* é reconhecido como fonte de compostos fenólicos, sendo que a espécie objeto deste estudo, *Acacia podalyriifolia*, apresentou considerável quantidade desta categoria de substâncias, encontrados com maior concentração na fração acetato de etila.

A atividade antioxidante foi avaliada pela determinação da captação do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) pelo extrato etanólico bruto, pelas frações diclorometano e acetato de etila e pelos padrões de ácido ascórbico e rutina. O padrão de ácido ascórbico demonstrou ser significativamente mais ativo que os demais. A fração acetato de etila apresentou atividade antioxidante significativamente maior que o extrato etanólico bruto e a fração diclorometano. Comparada ao padrão de rutina, a fração acetato de etila apresentou atividade similar, não sendo significativa a diferença nos valores de IC<sub>50</sub> obtidos.

Os resultados obtidos para a *Acacia podalyriifolia* confirmam o que já havia sido verificado com *A. catechu*, estudos realizados por Park; Boo (1991)



EEB: extrato etanólico bruto; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; AA: ácido ascórbico; RUT: rutina

Gráfico 1. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras (EEB, FDCM e FAE) e pelos padrões (ácido ascórbico e rutina).

Tabela 1. Atividade captadora do radical DPPH (IC<sub>50</sub>).

Amostras/Padrões	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Acido ascórbico	0,49
Rutina	4,14
Extrato etanólico bruto	10,48
Fração diclorometano	36,65
Fração acetato de etila	3,22

IC<sub>50</sub> = Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH

e Naik et al. (2003); *A. confusa* por Chang et al. (2001) e Wu et al. (2005); *A. nilotica* por Sallem et al. (2001); *A. pennata* por Thalang et al. (2001); mel obtido de flores de espécies diversas de *Acacia* por Al-Mamary et al. (2002) e Meda et al. (2005); *A. mangium* e *A. auriculiformis* por Mihara et al. (2005), que apresentaram efeitos antioxidantes importantes devido ao teor de substâncias fenólicas.

## CONCLUSÃO

Os estudos realizados com o extrato etanólico bruto e as frações diclorometano e acetato de etila, obtidos das flores de *Acacia podalyriifolia*, demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado na fração acetato de etila, o que explicaria a maior ação antioxidante, demonstrada pela atividade captadora de radical (IC<sub>50</sub>), ter sido observada com esta amostra.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao botânico Gert Hatschbach, do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal e ao estatístico Jorge Pontes pela análise estatística dos dados.

## REFERÊNCIAS

Rev. Bras. Farmacogn.  
Bras J Pharmacogn  
17(2): Abr/Jun. 2007

Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. *Nutr Res* 22: 1041-1047.

Anderson DMW, Bell PC 1976. Partial structural studies of four *Acacia* gums exudates of the series Phylloidinene. *Phytochemistry* 15: 301-303.

Andrade CA, Silva VC, Peitz C, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA 2003. Revisão do gênero *Acacia* - atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. *Visão Acadêmica* 4: 47-56.

Andrade CA, Peitz C, Cumico M, Carvalho JLS, Abrahao WM, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA 2005. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cum. ex. G. Dou Leguminosae-Mimosoideae. *Rev Bras Farmacogn* 15: 13-15.

Arnao MB, Cano A, Acosta M 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep* 5: 365-370.

Balandrin MF, Kinghorn AD, Smolenski SJ, Dobberstein RH 1978. Reverse-phase High-Pressure Liquid Chromatography of some tryptamine derivatives. *J Chromatogr* 157: 365-370.

Blois MS 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.

Burkut A 1979. Leguminosae - Mimosoideae. In: *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: P. Raulino Reitz, p.17-48.



- Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49: 3420-3424.
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakanyatham N 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem* 92: 491-497.
- Chhabra SC, Uniso FC 1990. A survey of medicine plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. *Fitoterapia* 4: 307-316.
- Churns SC, Merrifield EH, Stephen AM 1977. Structural features of the gum exudates from some *Acacia* species of the series Phyllodineae and Botrycephalae. *Carbohydr Res* 55: 3-10.
- Delazar A, Talischi B, Nazemiyeh H, Rezaadeh H, Nahar L, Sarker SD 2006. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 16: 286-290.
- Duarte MR, Wolf S 2005. Anatomical characters of the phyllode and stem of *Acacia podalyrifolia* A. Cunn. ex G. Don (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 71-76.
- Duroux L, Delmotte FM, Lancelin JM, Keravis G, Allemand C 1998. Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. *Biochem J* 333: 275-283.
- Gülçin I, Oktay M, Kurecci E, Küfrevioğlu OI 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 83: 371-382.
- Gyanfi MA, Youmine M, Aniya Y 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 32: 661-667.
- Hagos M, Samuelsson G 1988. Quantitative determination of quercetin A, B and (+)-fisetinidin in bark and gum of *Acacia tortilis*. *Acta Pharm Suec* 25: 321-324.
- Kambizi L, Afolayan AJ 2001. An ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted disease (ajovers) in Guruve District, Zimbabwe. *J Ethnopharmacol* 77: 5-9.
- Kerber VA, Silva GAAB 1993. Flavonóides da *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. - Leguminosae-Mimosoideae. *Rev Bras Farm* 74: 16-18.
- Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agric Food Chem* 48: 5338-5342.
- Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Goixéa CMCP 2006. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Rev Bras Farmacogn* 16: 531-536.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
- Mihara R, Barry KM, Mohammed CL, Mitsunaga T 2005. Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* heartwood extracts. *J Chem Ecol* 31: 789-804.
- Moreira DL, Engelhardt RL, Reis AS, Sanches EM, Leitão SG, Leitão GG 2002. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). *Rev Bras Farmacogn* 12(Supl.): 124-125.
- Nabi ABD, Reisinger EC, Reinthaler FF, Stull F, Eibel U, Krejs GJ 1992. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L.) Willd ex Del var. *nilotica* (Mimosaceae). *J Ethnopharmacol* 37: 77-79.
- Nahar L, Sarker SD 2005. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 279-282.
- Naik GH, Priyadarsinik K, Satao JG, Banavalikar MM, Sohoni DP, Biyani M, Mohan H 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry* 63: 97-104.
- Peitz C, Cúnico MM, Miguel OG, Miguel MD, Kerber VA 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). *Rev Bras Farmacogn* 13: 61-65.
- Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rota LD, Pauleni GF, Serafini LA 2003. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 13: 17-22.
- Park SN, Boo YC 1991. Flavonoids for protection of cells against chemically active species of oxygen, their extraction from plants, and their use in cosmetics. *Fv Damanda* 17 p.
- Saleem A, Ahotupa M, Pihlaja K 2001. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. *Z Naturforsch* 56c: 973-978.
- Sekine T, Fukasawa N, Ikegami F, Saito K, Fujii Y, Murakoshi I 1997. Structure and synthesis of a new monoterpene carboxamide from the seeds of the Thai medicinal plant *Acacia concinna*. *Chem Pharm Bull* 45: 148-151.
- Thalang VN, Trakoontivakorn G, Nakaharak K, Gassinee T 2001. Antioxidant activity of some commonly consumed leafy vegetables in Thailand. *Jircas J* 9: 35-43.
- White EP 1943. Alkaloids of the Leguminosae. *J Sci Tech* 25: 93-114.
- Wu JH, Tung YT, Wang SY, Shyur LF, Kuo YH, Chang ST 2005. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J Agric Food Chem* 53: 5917-5921.



