

**CRISTINA PEITZ**

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ALELOPÁTICO E  
ANTIMICROBIANO DE *Acacia longifolia* Andr. (Willd.)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Vítor Alberto Kerber

Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

**CURITIBA**

**2003**



## PARECER

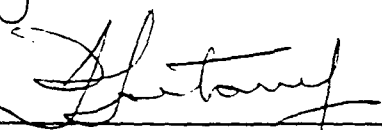
A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a dissertação de mestrado "Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.", de autoria da pós-graduanda CRISTINA PEITZ, composta pelos Professores Dr. Vitor Alberto Kerber (Orientador/Presidente) Dr. José Angelo Zuanazzi (UFRGS) e o Tit José Domingos Fontana (UFPR).

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 9,8, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

Curitiba, 21 de março de 2003.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Angelo Zuanazzi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Tit. José Domingos Fontana

À minha família pelo apoio e carinho

**Ao prof. Vitor Alberto Kerber,  
meus sinceros agradecimentos**

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Vítor Alberto Kerber pela orientação neste trabalho.

Ao prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela co-orientação e apoio.

À prof<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel pela orientação no estudo alelopático.

Ao botânico Gerdt Hatschbach do MBM de Curitiba pela identificação do material vegetal.

Ao prof. Valentin Emílio Uberti Costa da UFRGS - Porto Alegre pela realização dos espectros de RMN.

Às prof<sup>as</sup> Maria Madalena Gabriel e Marilu Lopes pelo uso do aparelho de espectroscopia de UV (Laboratório de Toxicologia da UFPR).

À Dr<sup>a</sup>. Carmen Etsuko Kataoka pelo fornecimento das cepas bacterianas.

À prof<sup>a</sup> Wanda Moscalewsky e a funcionária Geni Peruzzo pelo auxílio nos testes de atividade antibacteriana (Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR).

Ao prof. James Roper pela análise estatística

Ao Laboratório Catarinense pela disponibilidade do CLAE.

Aos professores Celso Garcia Auer e Albino Grigoretti Júnior pela avaliação da atividade fungitóxica (EMBRAPA-FLORESTAS).

Ao prof. Paulo Cesar Sander pelos ensinamentos na área de produtos naturais.

Aos amigos Miriam Machado Cunico, Ana Carolina Winkler Heemann, Jane Manfron Budel e João Luiz Souza Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha família.

E a todos que colaboram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ixv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	04
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	04
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>05</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A FAMÍLIA LEGUMINOSAE .....	05
2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Acacia</i> .....	06
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Acacia longifolia</i> (Andr.) Willd. ....	11
2.4 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO .....	13
2.5 ASPECTOS QUÍMICOS DE <i>Acacia longifolia</i> (Andr.) Willd. ....	13
2.6 ALELOPATIA .....	14
2.6.1 CONCEITO E IMPORTÂNCIA .....	14
2.6.2 AGENTES ALELOPÁTICOS .....	15
2.6.3 <i>Acacias</i> COM EFEITO ALELOPÁTICO .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	20
3.2 ESTABILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL .....	20

3.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES .....	20
3.4 SEPARAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES .....	21
3.5 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES .....	23
3.6 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES .....	26
3.7 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS .....	27
3.7.1 PESQUISA DE ÓLEO VOLÁTIL .....	27
3.7.2 PESQUISA DOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS .....	27
3.7.2.1 EXTRATO AQUOSO A 20% .....	27
3.7.2.2 EXTRATO ALCOÓLICO A 20% .....	28
3.8 ISOLAMENTO DA NARINGENINA .....	29
3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	31
3.9.1 TESTE DO CRESCIMENTO .....	31
3.9.2 TESTE DE GERMINAÇÃO .....	33
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	35
3.10.1 PREPARO DOS EXTRATOS .....	35
3.10.2 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	35
3.10.3 PREPARO DO INÓCULO .....	36
3.10.4 TESTE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	37
3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	38
3.11.1 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	39
3.11.2 TESTE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	39

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES .....	40
4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA PRESENTE NA FRAÇÃO AC3 .....	40
4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA PRESENTE NA FRAÇÃO AC1 .....	49
4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS .....	51
4.2.1 PESQUISA DE ÓLEO VOLÁTIL .....	51
4.2.2 PESQUISA DOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS .....	51
4.2.2.1 EXTRATO AQUOSO A 20% .....	51
4.2.2.2 EXTRATO ALCOÓLICO A 20% .....	52
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	53
4.3.1 TESTE DO CRESCIMENTO .....	53
4.3.2 TESTE DA GERMINAÇÃO .....	57
4.3.3 DISCUSSÃO GERAL DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	60
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	63
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	68
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - <i>Acacia longifolia</i> .....	11
FIGURA 2 - <i>Acacia longifolia</i> .....	12
FIGURA 3 - EXTRATOR LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	21
FIGURA 4 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES .....	22
FIGURA 5 - PICOS PRINCIPAIS NO ULTRAVIOLETA .....	24
FIGURA 6 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO AcOEt .....	25
FIGURA 7 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO DA NARINGENINA .....	30
FIGURA 8 - CAIXA GERBOX COM 25 SEMENTES .....	32
FIGURA 9 - CAIXA GERBOX APÓS 7 DIAS DE GERMINAÇÃO .....	32
FIGURA 10 - ESQUEMA DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	34
FIGURA 11 - MORANGO COM ANTRACNOSE .....	38
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-O-GALACTOSIL AUREUSIDINA .....	42
FIGURA 13 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA LUZ UV DA SUBSTÂNCIA AC3 .....	45
FIGURA 14 - ESPECTRO DE <sup>1</sup> H RMN DA SUBSTÂNCIA AC3 .....	46
FIGURA 15 - ESPECTRO DE <sup>13</sup> C RMN DA SUBSTÂNCIA AC3 .....	47
FIGURA 16 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO H-C TIPO HMQC .....	48

FIGURA 17 - ESPECTRO DE $^1\text{H}$ RMN DA FRAÇÃO AC1 .....	50
FIGURA 18 - PERCENTUAL DE CRESCIMENTO FRAÇÃO HEXANO E CLOROFÓRMIO .....	55
FIGURA 19 - PERCENTUAL DE CRESCIMENTO FRAÇÃO AcOEt E EXTRATO FOLHAS .....	56
FIGURA 20 - PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO FRAÇÃO HEXANO E CLOROFÓRMIO .....	58
FIGURA 21 - PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO FRAÇÃO AcOEt E EXTRATO FOLHAS .....	59
FIGURA 22 - PLACAS COM <i>S. aureus</i> .....	65
FIGURA 23 - PLACAS COM <i>E. coli</i> .....	65
FIGURA 24 - PLACAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	65
FIGURA 25- PLACAS COM O EXTRATO FRACIONADO .....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO .....	13
TABELA 2 - SISTEMA GRADIENTE EMPREGADO NA CLAE .....	23
TABELA 3 - PRINCIPAIS FRAÇÕES SEPARADAS NO CLAE .....	24
TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES SUBMETIDAS AO TESTE DE CRESCIMENTO .....	31
TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES SUBMETIDAS AO TESTE DE GERMINAÇÃO .....	33
TABELA 6 - PRINCIPAIS $\lambda$ NO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA AC3 .....	40
TABELA 7 - DADOS DE ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	43
TABELA 8 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO .....	51
TABELA 9 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ALCOÓLICO .....	52
TABELA 10 - HALO DE INIBIÇÃO DO CLORANFENICOL 30 $\mu\text{g}$ SOBRE AS CEPAS.....	63
TABELA 11 - RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO .....	64
TABELA 12 - RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO FRACIONADO .....	64
TABELA 13 - RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\epsilon$	Absortividade Molar
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{l}$	Microlitros
%	Por cento
$^1\text{H}$ RMN	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
$^{13}\text{C}$ RMN	Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$
AC1	Substância Presente na Fração 1
AC3	Substância Presente na Fração 3
$\text{AlCl}_3$	Cloreto de Alumínio
AcOEt	Acetato de etila
Andr.	Andrews
ATCC	American Type Culture Collection
Atm	Atmosfera
BDA	Ágar Batata Dextrose
bs	Singleto Alargado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
g	Gramas
h	Hora
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido Sulfúrico
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
log	Logaritmo
MBM	Museu Botânico Municipal
MeOH	Metanol
min	Minuto
mg	Miligrama
ml	Mililitro
m	Multiplete
mm	Milímetro
N	Normal
NaOAc	Acetato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaOMe	Metóxido de Sódio
NEU	Difenilboriloxietatilamina
nm	Nanômetros
n°	Número
p	Para
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por Milhão
PR	Paraná
s	Singleto
UV	Ultravioleta
Willd	Willdenow

## RESUMO

*Acacia longifolia* (Andr.) Willd. é uma espécie nativa da Austrália, encontrada na região Sul do Brasil, utilizada como ornamento e fixadora de dunas de areia. Por meio de CLAE semipreparativa realizada com a fração Acetato de Etila obtida a partir de um extrato etanólico das flores foi isolada uma substância pura. A análise espectroscópica (UV,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN) seguida de hidrólise e CCD comparativa da porção osídica com açúcares conhecidos permitiu a identificação desta substância como sendo a 4-*O*-galactosil-auresidina. O estudo da atividade alelopática demonstrou que a fração clorofórmio das flores apresentou elevada inibição sobre a germinação das sementes e o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Latuca sativa*. O estudo da atividade antimicrobiana revelou que o extrato bruto etanólico das folhas, sua fração acetato de etila e alcoólica remanescente, na concentração de 1000  $\mu\text{g}$ , apresentaram halo de inibição de crescimento para a bactéria *Staphylococcus aureus*. A fração acetato de etila obtida a partir de um extrato etanólico das flores na concentração de 1000 ppm demonstrou moderada inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e um efeito menos pronunciado sobre *Cylindrocladium spathulatum*.

## ABSTRACT

*Acacia longifolia* (Andr.) Willd. is a native small tree from Australia, and it's found in South Region of Brazil usually used for garden ornamentation or to fix sand hills. Through semi-preparative HPLC system applied to the ethyl acetate fraction obtained from an ethanolic extract of the flowers it was isolated a compound. This compound was identified as auresidin-4-*O*-galactoside (an auron) using spectroscopic methods such as UV, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR followed by hydrolysis and TLC of the sugar moiety in comparison with authentic samples. Allelopathic study demonstrated that chloroform fraction has a high level of inhibition of seeds germination and inhibition of the growth of the radicle and of the hypocotyl of *Lactuca sativa*. In other study it was found an inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* with 1000 µg doses of the ethanolic extract from the leaves and its ethyl acetate and alcoholic ending fractions at the same doses. Studying fungi toxic activity against *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocladium spathulatum* it was found that the ethyl acetate fraction of the flowers at 1000 ppm concentration has a moderated inhibition of the mycelial growth of the first and lower for the second.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais, com fins de tratamento, cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização. Esta prática milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos no processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recursos terapêuticos (STASI *et al.*, 1996).

Empiricamente o homem aprofundou seus conhecimentos afim de melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução (MIGUEL & MIGUEL, 1999).

Os compostos de origem natural desempenham importante papel na medicina moderna, fornecendo um grande número de drogas que de outra forma seria muito difícil ou mesmo impossível de se produzir comercialmente por meios sintéticos (ROBBERTS; SPEEDIE; TYLER, 1996).

Os produtos naturais especialmente após a Segunda Guerra Mundial foram esquecidos, acreditando-se obter fármacos somente por meio da síntese de um grande número de compostos e o seu teste ao acaso, sem nenhuma orientação. Somente por volta de 1970, quando a Organização Mundial da Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa, e com o surgimento de alguns importantes medicamentos obtidos de fontes naturais, foi que cientistas e indústrias voltaram a se interessar por esse ramo. Pode-se observar que atualmente, os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerando os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem é de aproximadamente 70% (YUNES & CALIXTO, 2001).

Segundo SOULÉ, 1991, Brasil, México, Equador, Colômbia, Peru, China, Malásia, Índia, Indonésia, Zaire, Madagascar e Austrália são considerados países detentores de grande biodiversidade. Dados demonstram que a mesma encontra-se seriamente ameaçada. O ritmo atual de extinção de plantas é entre 50 a 100 vezes maior que as taxas médias observadas no passado mais recente. Considera-se que

mantendo o ritmo atual de extinção nos trópicos, quase a totalidade das florestas serão eliminadas nas áreas não protegidas até o ano 2100.

A destruição contínua destes ecossistemas, além do desequilíbrio ecológico, leva a perda do conhecimento acumulado por milênios, sobre o uso medicinal tradicional destas plantas pelas populações a elas associadas, representando um enorme prejuízo à sociedade, uma vez que inviabilizam pesquisas científicas que poderiam levar a descoberta de novos fármacos.

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com propriedades terapêuticas pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação estrutural de substâncias naturais ou sintéticas, com propriedades farmacológicas definidas, e extração, isolamento e purificação de novos compostos, de fontes naturais, especialmente de origem vegetal. As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas como um recurso potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (STASI *et al.*, 1996).

Os constituintes farmacologicamente ativos podem ser substâncias isoladas representadas por glicosídeos, terpenóides, esteróides, fenilpropanóides e alcalóides, ou por misturas como gomas, óleos fixos, ceras, resinas e óleos voláteis .

Estes constituintes além do efeito farmacológico podem apresentar efeito alelopático sobre outras plantas, ou seja podem inibir ou estimular o crescimento de outro vegetal. A produção de substâncias alelopáticas é um mecanismo de proteção e defesa contra o ataque de pragas, patógenos e pode representar um meio de competição entre as plantas.

O estudo desta ação sobre os demais vegetais com extratos ou substâncias isoladas, é muito importante pois leva à procura de novos modelos de herbicidas, uma vez que a agricultura moderna faz uso de agrotóxicos prejudiciais à saúde humana, e que não existem produtos sintéticos recomendados para culturas de plantas medicinais, estas ficam submetidas a compostos químicos tóxicos. Desta forma, torna-se necessária à busca de novos herbicidas, que não causem tamanho prejuízo ao meio ambiente e à saúde do homem.

Seguindo a mesma linha, pode-se aplicar também os extratos e substâncias isoladas de plantas ainda não estudadas na pesquisa de novas estruturas pesticidas, aliado a probabilidade de se encontrar agentes estimuladores da germinação e do crescimento como alguns hormônios.

Neste trabalho objetivou-se realizar um estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd., árvore originária da Austrália, utilizada como fixadora de dunas e como planta ornamental.

Considerando o potencial efeito alelopático de algumas espécies do gênero *Acacia*, foram realizados estudos dos extratos de *Acacia longifolia* sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* (alface), verificando a possibilidade de uso como herbicida natural.

Um estudo antibacteriano foi realizado com o extrato das folhas para avaliar possível inibição sobre o crescimento de bactérias patogênicas ao homem. Neste trabalho, foi avaliado também a atividade fungitóxica sobre fungos patogênicos para diversas culturas agrícolas.

Sendo assim, *Acacia longifolia* enquanto espécie de interesse nesta pesquisa poderá contribuir com a busca de novas substâncias, além da aplicabilidade de seus extratos junto a atividade alelopática e microbiológica.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de flores e folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar compostos presentes na fração AcOEt das flores.
- Realizar estudo fitoquímico das folhas.
- Avaliar atividade alelopática da naringenina e dos extratos de flores e folhas.
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11129) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos AcOEt das flores e etanólico das folhas contra os fungos *Colletotricum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium sphaulatum*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae compreende uma das maiores dentre as dicotiledôneas, mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13000 espécies, espalhadas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1985).

São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas e estípelas às vezes transformadas em espinhos. As folhas às vezes podem apresentar-se modificadas em gavinhas (*Lathyrus*) ou estar reduzidas a dois (*Hymenaea*) ou a um só folíolo (*Spartium*). Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, seja do pecíolo, seja dos peciólulos, que permitem movimentos diurnos aos folíolos e folhas. Flores variadas, sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala, pentâmera ou tetrâmera. Androceu formado por 4 ou 10 estames, livres ou soldados entre si. Ovário súpero, unicarpelar e unilocular. Fruto variado, em geral legume, seco, deiscente por 2 valvas ou do tipo lomento, segmentando-se (*Desmodium*, *Mimosa*) ou seco indeiscente (*Arachis*, certas espécies de *Cassia*) ou de pericarpo mais ou menos carnosos (*Andira*). As sementes às vezes são envoltas em mucilagem ou polpa doce (*Inga*), ou com arilo (*Copaifera*) ou ainda com testa duríssima (*Ormosia*) (JOLY, 1985).

As Leguminosas vivem, na sua grande maioria, em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Estas bactérias apresentam a faculdade de fixar nitrogênio da atmosfera e transformar em aminoácidos e finalmente a proteínas pela combinação com ácidos orgânicos (BURKART, 1979).

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias; Papilionaceae, Mimosoideae e Caesalpinoideae, contendo respectivamente cerca de 377, 40 e 133 gêneros. As subfamílias Mimosoideae e Caesalpinoideae são em sua maioria plantas

tropicais, enquanto a subfamília Papilionaceae ocorre em regiões tropicais e temperadas. Os representantes da família Leguminosae são muito similares aos da família Rosacea, ambas contém glicosídeos cianogenéticos, saponinas taninos, mucilagens e antocianidinas (EVANS, 1996). Na família Leguminosae são relativamente comuns alcalóides, alguns deles muito ativos e tóxicos (QUER, 1988).

A subfamília Mimosoideae é a menor entre as Leguminosae, possuindo cerca de 40 gêneros. São plantas subarborescentes, arbustivas ou arbóreas, de folhas freqüentemente duplamente pinadas. A flor apresenta simetria radial, podendo ser pentâmera ou tetrâmera, diclamídea e hermafrodita. As flores apresentam-se reunidas em densas inflorescências capituliformes, esféricas ou alongadas. Estames isômeros com a corola ou em número duplo livres entre si (JOLY, 1985).

Dentre os gêneros cultivados destacam-se várias espécies de *Acacia*, introduzidas principalmente da África como acácia-negra, a acácia-mimosa entre outras, contendo substâncias tânicas utilizadas nos curtumes. A casca de espécies de *Styphnodendron* (barbatimão) dos cerrados é utilizada para o mesmo fim. Dentre os gêneros brasileiros de maior utilidade destacam-se *Piptadenia* (angico) com a madeira utilizada para vários fins e *Inga* utilizado no sombreamento de certas culturas de café e com frutos comestíveis (JOLY, 1985).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO *Acacia*

O gênero *Acacia* compreende árvores, arbustos ou trepadeiras lenhosas, armadas em espinhos ou acúleos; as folhas são paribipinadas (em espécies australianas reduzidas a filódios, que parecem folhas de lâmina simples), com espigas axilares (BURKART, 1979).

O gênero *Acacia* apresenta dispersão cosmopolita tropical e subtropical. Existem aproximadamente 750 espécies, a metade das quais presente na Austrália, onde se tem manifestado extraordinário endemismo e proliferação evolutiva de espécies com filódios. Muitas espécies, particularmente as australianas, são cultivadas como

ornamento, algumas por sua madeira, outras devido aos taninos (usados em curtumes), gomas, essências e para o florestamento de dunas. Todas apresentam flores melíferas (BURKART, 1979).

Várias espécies de *Acacia* são utilizadas para fazer gomas, a mais empregada na medicina é a goma arábica, utilizada como agente suspensor, ela é o produto do exsudato do tronco de *Acacia senegal* e outras espécies de *Acacia* (GRIEVE, 1998).

O extrato metanólico das cascas de *Acacia senegal* apresentou efeito antimicrobiano sobre as bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Actinomyces viscosus*, e sobre a levedura *Candida albicans* em método da difusão em ágar e concentração inibitória mínima (KHAN; NGASSAPA; MATEE, 2000).

A casca de *Acacia decurrens* apresenta taninos e ácido gálico, o seu pó é empregado em curtumes, medicinalmente é utilizada em diarreias, principalmente na forma de decocto (GRIEVE, 1998).

A *Acacia nilotica* é tradicionalmente utilizada para o tratamento de dor de garganta, resfriados, bronquites, pneumonia, diarreia e hemorróidas, devido suas propriedades tônicas, adstringentes e estimulantes. Os extratos aquosos dos frutos mostraram atividade contra *Candida albicans* e bactérias Gram positivas e negativas. Os extratos obtidos a 97 °C aparentaram ser ligeiramente mais ativos que os obtidos a 37, 55 e 70 °C (NABI *et al.*, 1992). A *Acacia nilotica* apresentou potente atividade anti-helmíntica em cultura de tecidos e atividade contra bactérias Gram positivas (KHAFAGI, 1999). No Zimbábue a *Acacia nilotica* é utilizada no tratamento de DST, seu extrato apresentou significativa ação sobre bactérias Gram positivas e negativas (KAMBIZI & AFOLAYAN, 2001). A *Acacia nilotica* é tradicionalmente utilizada como medicamento no Sudam e nos países árabes, os extratos aquoso e etanólico dos frutos, apresentaram atividade contra cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos, e o extrato hexânico apresentou atividade contra *Candida albicans* (MUSTAFA; TANIRA; NSANZE, 1999). O extrato das folhas de *Acacia nilotica* demonstrou efeito antimicrobiano sobre *Clostridium perfringens*, correlacionando o efeito ao teor de taninos (SOTOHY; ISMAIL; MUELLER, 1995). *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus* e *Klebsiella* spp. apresentaram

elevada a moderada sensibilidade a extratos aquosos e etanólicos de *Acacia nilotica* (CHANDEL; SHAH; TRIPATHI, 1993).

A *Acacia nilotica* apresentou marcante atividade molusquicida contra *Biomphalaria alexandrina* (NAZIF; SOLIMAN; RADWAN, 2001).

O extrato metanólico dos frutos de *Acacia nilotica* causou efeito anti-hipertensivo em ratos e anti-espasmódicos em coelhos (GILANI *et al.*, 1999). Segundo AMOS *et al.*, 1999, o extrato aquoso das sementes elevou a pressão arterial em gatos anestesiados e demonstrou efeito espasmódico. O extrato aquoso de *Acacia nilotica* em ensaio em ratos e camundongos inibiu o desenvolvimento de edema na pata e diminuiu a indução de febre (DAFALLAH, MUSTAFA, 1996).

O extrato dos frutos de *Acacia nilotica* bloqueou a agregação plaquetária mediada por ácido araquidônico (SHAH *et al.*, 1997).

KHALID e colaboradores, 1989, isolaram das cascas de *Acacia nilotica* (+)-catequina 5-galoil éster, ácido gálico, naringenina e (+)-catequina. Do extrato acetato de etila dos frutos e das cascas de *Acacia nilotica* foram isolados dois flavonóis galato de (-) epigalocatequina e digalato de (-) epigalocatequina (AYOUB, 1985).

O óleo de *Acacia farnesiana* é bastante empregado em perfumaria (EVANS, 1996). Foram identificados três flavonóides nas vagens de *Acacia farnesiana*; a naringenina 7-O- $\beta$ -(4'',6''-digaloilglucopiranosídeo), quercetina 7-O- $\beta$ -(6''-galoilglucopiranosídeo) e miricetina 7-O- $\beta$ -(6''-galoilglucopiranosídeo), juntamente com naringenina e kaempferol 7-O- $\beta$ -(6''-galoilglucopiranosídeo) (BARAKAT *et al.*, 1999).

O extrato etanólico de *Acacia laeta* e o composto isolado das folhas a apigenina 8-C- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, apresentaram atividade anticâncer (NASSAR, 1999)

As cascas de *Acacia confusa* demonstraram forte efeito antioxidante para vários ensaios, como peroxidação de lipídeos e da descoloração do radical livre 1,1,-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) entre outros (TZEN *et al.*, 2001).

Miricetina 3-O-(2''-galoil)- $\alpha$ -ramnopiranosídeo-7 -metil- éter, miricetina 3-O-(3''-O-galoil)- $\alpha$ -ramnopiranosídeo 7-metil-éter e miricetina 3-O-(2''-galoil)- $\alpha$  -ramnosídeo foram isolados das folhas de *Acacia confusa* (HUEI *et al.*, 2000).

O extrato aquoso dos galhos de *Acacia catechu* apresentou efeito hipotensor em cães e ratos (SHAM; CHIU; PANG, 1984). JAYASEKHAR; MOHANAN; RATHINAM, 1997, comprovaram o efeito hepatoprotetor em ratos da fração acetato de etila da *Acacia catechu*. Esta apresentou como principal constituinte fenólico a catequina (AZUINE; BHIDE, 1994).

Em teste com camundongos a *Acacia auriculiformis* apresentou potencial efeito antidepressivo, encontrado na fração butanólica do extrato da planta. Neste estudo ocorreu o isolamento de auricolosídeo (SAHAI; AGARWAL; RASTOGI, 1980). Os acaciasídeos A e B de *Acacia auriculiformis* apresentam atividade anti-helmíntica (BABU *et al.*, 1997).

A *Acacia pennatula* exibiu atividade citotóxica sobre tumores de células humanas (POPOCA *et al.*, 1998).

O extrato aquoso de *Acacia stroyi* apresentou elevado teor de polifenóis e taninos (YAZAKI, 1997).

A goma de *Acacia tortilis* é tradicionalmente utilizada na Somália como medicamento contra asma, conhecido como Qurac. (HAGOS & SAMUELSSON, 1988). A *Acacia tortilis* apresenta quracol A (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3-hidroxifenil)-propan-2-ol) e quracol B (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-hidroxifenil)-propan-2-ol) e fisetinidol (HAGOS & SAMUELSSON, 1988). A mesma apresentou atividade contra *Candida albicans* (MUSTAFA; TANIRA; NSANZE, 1999).

Segundo CLEMENT e colaboradores, 1997, o consumo de *Acacia berlandieri* por ovelhas e cabras durante os períodos de seca no Texas resultaram em ataxia locomotora, bem como efeito sobre a fertilidade dos animais, isto devido às aminas e alcalóides presentes na planta. Em estudos realizados nas folhas foram identificados 29 alcalóides e aminas, entre eles encontrou-se nicotina, nornicotina, mescalina, mimosina e anfetaminas.

A *Acacia rigidula* também apresentou efeitos tóxicos devido a alcalóides e aminas tóxicas, entre eles se encontram nicotina, N,N-dimetiltriptamina, mescalina, vários alcalóides tetra-hidroisoquinolínicos e anfetaminas (CLEMENT; GOFF; FORBES, 1998).

As sementes de *Acacia concinna* são utilizadas para o tratamento de doenças de pele, SEKINE e colaboradores, 1997, isolaram da semente uma carboxiamida monoterpeneal a concinamida, sendo elucidada como (*E*)-2,6-dimetil-6-hidroxi-2,7, octadienamida.

A *Acacia rehmanniana* apresentou elevada atividade inibitória sobre a ciclooxigenase (GAW *et al.*, 1997).

Análise do extrato das flores de *Acacia latifolia* apresentou a quercetina 7-glucosídeo como sendo o maior componente (VOIRIN *et al.*, 1986).

No extrato das folhas de *Acacia saligna* foram identificados quercetina-3-ramnosídeo, kaempferol-3-glucosídeo e miricetina-3-ramnosídeo (SISSI & SHERBEING 1967).

FOURIE; PREEZ; ROUX, 1972, isolaram de *Acacia nigrescens* compostos do grupo da melacacidina e iso-melacacidina.

MALAN & SWARTZ 1995 isolou o dímero (2*S*)-7,8,4'-trihydroxyflavan-epioritin-4- $\alpha$ -ol, a proteracacinidina *ent*-oritin-(4- $\beta$ -5)epioritin-4- $\beta$ -ol com 8-*O*-metilepioritina-4- $\alpha$ -ol, 3-*O*-metil-7,8,4'-trihidroxi-flavona de *Acacia caffra*.

Derivados de catequina em *Acacia melanoxyton* apresentaram potente atividade inibitória de proteína quinase C em cérebro de ratos (POLYA & FOO, 1994).

### 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.

A *Acacia longifolia* é um arbusto ou árvore pequena, de 4-5 m de altura, ramos pendentes, filódios sublanceolados, oblíquos, inteiros, verde-azulado, 2-3 nervados na base e com glândula no ápice, inteiros, aglomerados no ápice; flores amarelas dispostas em espigas geminadas axilares, compridas e cilíndricas (CORRÊA, 1926).

Sinonímia científica: *Acacia decussata* Tenore, *Acacia dependens* Aunn., *Acacia spathulata* Tausch., *Acacia trigonocarpa* Aunn.

Sinonímia comum: acácia da Austrália, mimosa de flores amarelas

FIGURA 1 - *Acacia longifolia*



Fonte: <http://www.labspec.co.za/GIF/trees/acacia.gif>

FIGURA 2 - *Acacia longifolia*



Fonte: <http://www.hear.org/pier3/images/aclonp3.jpg>

A *Acacia longifolia* é planta originária da Austrália, utilizada como ornamental, adapta-se perfeitamente como fixadora de areia de dunas e de terrenos íngremes sujeitos a erosão (BURKART, 1979).

## 2.4 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

O enquadramento taxonômico segundo ENGLER (1964) e CRONQUIST (1981), segue abaixo:

TABELA 1- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

	Engler	Cronquist
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Rosidae
Ordem	Rosales	Fabales
Família	Leguminosae	Mimosaceae
Subfamília	Mimosoideae	.....
Tribo	Acacieae	.....
Gênero	<i>Acacia</i>	<i>Acacia</i>
Espécie	<i>Acacia longifolia</i> (Andr.) Willd.	<i>Acacia longifolia</i> (Andr.) Willd.

## 2.5 ASPECTOS QUÍMICOS DE *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.

Em 1951 MARINI-BETTOLO e FALCO verificaram a presença de naringenina em flores de *Acacia longifolia*. KERBER e SILVA, 1990, isolaram escopoletina, e em 1993 confirmaram a presença de naringenina nas flores. SILVA, 2001 identificou dois heterosídeos da naringenina, presentes na fração acetato de etila das flores de *Acacia longifolia*, o 5-β-D-galactosil-naringenina e a 5-β-D-glucosil-naringenina.

Nas folhas de *Acacia longifolia* foram identificados o alcalóide N,N-dimetil-triptamina (DMT) (ROVELI & VAUGHAN, 1967), catequina e galo-catequina (TINDALE & ROUX, 1969) e o ácido gentísico (THIEME & KHOGALI, 1975).

## 2.6 ALELOPATIA

### 2.6.1 CONCEITO E IMPORTÂNCIA

Plantas liberam compostos químicos que podem afetar a germinação e ou crescimento de diferentes espécies que crescem ao seu redor. Este fenômeno é definido como alelopatia (OHNO *et al.*, 2001).

O termo alelopatia foi usado por Hans Molisch em 1937 em seu trabalho "Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie", para referir as interações bioquímicas de benefício e de prejuízo entre todas as classes de plantas (YAMADA; ANAI; HASEGAWA, 1995). O termo alelopatia deriva das palavras gregas allelon (mútuo) e pathos (prejuízo) (YUNES & CALIXTO, 2001).

O conhecimento de que uma planta pode interferir em outra não é uma observação recente, existem registros feitos por Democritus (500 a.C.), Theophrastus (300 a.C.), Plínio (1 d.C.), Culpeper (1633), Browne (1658), Young (1804), De Candolle (1832) e Beobachter (1845), sobre a capacidade que certas plantas possuem de interferir na fisiologia de outras espécies vegetais (YUNES & CALIXTO, 2001).

Na agricultura moderna procura-se elevada produtividade, e para isso conta com o uso de produtos químicos sintéticos para o controle de ervas daninhas e outras pragas. É evidente que isto melhora a produção, mas ao mesmo tempo causa um impacto negativo na qualidade do meio ambiente e na saúde humana.

Os compostos utilizados com o decorrer do tempo tornam-se ineficazes, adquirindo resistência. As fitotoxinas naturais constituem uma larga reserva de compostos com elevado potencial na agricultura, podendo-se desta forma utilizar sítios receptores ainda não explorados pelos herbicidas sintéticos. Sendo assim, os compostos alelopáticos servem de modelo para produção de novos herbicidas (MACIAS *et al.*, 2000).

## 2.6.2 AGENTES ALELOPÁTICOS

Os agentes alelopáticos ou aleloquímicos, com algumas exceções são metabólitos secundários. Atualmente existem cerca de 10 000 metabólitos secundários com ação alelopática. Os compostos já identificados pertencem a diversos grupos químicos, atribuindo-se maior importância aos terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (YUNES & CALIXTO, 2001).

Segundo GONZÁLEZ; SOUTO; REIGOSA, 1995, as substâncias alelopáticas podem ser liberadas pelas folhas, caules, raízes ou flores sob diversas formas:

- A) exsudação das raízes
- B) lixiviação das partes aéreas pela ação da chuva ou orvalho
- C) liberação de substâncias voláteis
- D) resíduos da decomposição de material que atinge o solo

De forma geral existem duas formas de alelopatia, uma resultante da decomposição de material no solo e outra resultante do agente alelopático existente na planta. Os agentes aleloquímicos podem influenciar diversas funções fisiológicas nas plantas, tais como: absorção de nutrientes, regulação do crescimento, fotossíntese, respiração, permeabilidade de membranas, síntese protéica e atividade enzimática (YUNES & CALIXTO, 2001).

Segundo MACIAS; SIMONET; ESTEBAN, 1994, os terpenóides lupanos de *Melilotus messanensis* apresentam potencial atividade alelopática.

Os extratos aquosos das folhas de girassol apresentam cinco guaianóides, os anulóides A a E. Os anulóides B e C possuem efeito alelopático sobre sementes de *Lactuca sativa*. O anulóide B inibiu na concentração de  $10^{-5}$  M 71% da germinação das sementes e o anulóide C inibiu na concentração de  $10^{-6}$  M, 62% da germinação (MACIAS *et al.*, 1993).

O composto 4,15-dinor-3-hidroxi-1(5)-xanteno-12,8-olide, isolado do exudato da germinação de girassol inibiu na concentração de 30 ppm, 50% da germinação de sementes de cat's-eyes (OHNO *et al.*, 2001).

O parthenin um composto presente em *Parthenium hysterophorus*, inibiu na concentração de 190  $\mu\text{M}$ , 74% do crescimento da radícula de *Bidens pilosa* e 49% o crescimento da radícula de *Avena fatua*, na concentração de 760  $\mu\text{M}$ , inibiu 93 % do crescimento de ambas as espécies (BATISH *et al.*, 2002).

Segundo SCHULZ *et al.*, 1994, os ácidos  $\beta$ -hidroxibutírico, 4-hidroxi-cinâmico, ferúlico, vanílico, siríngico, protocatéquico apresentam efeito alelopático.

ZHU & MALLIK, 1994, estudando o extrato aquoso das folhas de *Kalmia angustifolia* verificaram a presença de substâncias alelopáticas, entre elas: ácido ferúlico, vanílico, siríngico, genístico, *m*-cumárico, *o*-hidroxifenilacético e *p*-benzóico.

TAKAHASHI; OTANIS; HAGINO, 1993, atribuíram o efeito alelopático de exsudatos das raízes de *Lolium perenne* os ácidos graxos mirístico, palmítico, oleico e esteárico.

WALLER; JURZYSTA; THORNE, 1993, estudando as saponinas das raízes de alfafa (*Medicago sativa*) verificaram ação alelopática sobre *Triticum aestivum*.

HASEGAWA *et al.*, 1992, identificaram um lepidemoide com efeito alelopático o 2-*O*-ramnopiranosil-4-desoxi-threo-hex-4-enopiranosiduranato de sódio na mucilagem de *Lepidium sativum*.

O ácido graxo poliinsaturado isolado de algas vermelhas e identificado como ácido (5 Z, 8 Z, 11 Z, 14 Z e 17 Z) - eicosapentaenóico apresentou efeito alelopático (SUZUKI *et al.*, 1996).

O L-triptofano causou inibição do crescimento da radícula em 50% e do hipocótilo em 40% de *Lactuca sativa*, na concentração de 0,21 e 0,43 mM respectivamente (KATO *et al.*, 1994).

O ácido clorogênico isolado de *Lolium perenne* apresentou elevado efeito alelopático sobre a germinação e o crescimento de *Trifolium repens*. Comparativamente o efeito dos ácidos cafeico e quínico foi maior que o do ácido clorogênico (TAKAHASHI *et al.*, 1992).

Os isotiocianatos do extrato acetato de etila de *Rorippa indica* são responsáveis pelo seu efeito alelopático (YAMANE *et al.*, 1992).

A lactona iridóide tetracíclica, plumericina isolada de *Duria hirsuta* apresentou forte inibição no crescimento da radícula de *Lactuca sativa* (PAGE; MADRIMAN; TOWERS, 1994).

RAMAMOORTHY & PALIWAL, 1993, identificaram os aleloquímicos de *Gliricídia sepium* como sendo ácido gálico, protocatéquico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, gentísico,  $\beta$ -resorcílico, *o*-cumárico, sinápico e miricetina.

LI *et al.*, 1992, identificaram os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, vanílico, *p*-hidroxibenzóico e *p*-hidroxibenzaldeído como sendo os principais aleloquímicos de *Sasa cernua*.

Segundo INDERJIT, 1992, o isoflavonóide formonometina 7-*O*-glucosídeo (ononina) apresenta potencial efeito alelopático.

O óleo volátil de *Chenopodium ambrosioides*, constituído de  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, limoneno e ascaridol, reduziu a germinação e o crescimento de *Amaranthus hypochondriacus* (JIMENEZ, 1996).

Segundo ZHEN *et al.*, 1996, o óleo volátil de *Ajania tenuifolia* apresenta potencial alelopático. Seus principais constituintes são a cânfora, pilegone e 1,8-cineol.

O composto 1,8-cineol inibiu a germinação e o crescimento de *Brassica campestris*, interferindo na síntese de DNA (KOITABASHI, 1997).

HU & KONG, 1997, verificaram ação alelopática dos compostos isolados de *Ageratum conyzoides*: precoceno I, precocenol e estigmasterol-5,22-dieno-3- $\beta$ -ol.

O composto 5-cloro-6-metoxi-2-benzoaxolinona causou inibição do crescimento da raiz de *Avena sativa*, *Phleum pratense* e *Lactuca sativa* (KATO; KOSEMURA; YAMAMURA, 1998).

O ácido vanílico e  $\beta$ -sitosterol foram isolados de *Allium fistulosum* e identificados como inibidores do crescimento de Compositae (CHOI *et al.*, 1998).

Os compostos isolados de *Dianthus caryophyllus*, 3-*O*-glucopiranosídeo e 3,28-*O*-di-glucopiranosídeo inibiram o crescimento de raízes de *Lepidium sativum* (GUMNICKA & OLERZEK, 1998).

O alcalóide 6,6'-dihidroxiobinufaridine isolado de *Nymphaea odorata* apresentou elevada inibição do crescimento de *Lactuca sativa* (ELAKOVICH; SPENCE; YANG 1997).

O ácido *p*-hidroximandílico isolado de *Echinohloa crus-galli* apresentou forte inibição do crescimento das plantas testadas (YAMAMOTO, *et al.*, 1999).

Segundo MACIAS *et al.*, 2000, o produto natural dehidrozaluzamin C, uma lactona sesquiterpênica é considerada um potente regulador do crescimento de plantas, e um bom candidato para o desenvolvimento de um novo modelo de herbicida.

### 2.6.3 Acacias COM EFEITO ALELOPÁTICO

A *Acacia menoxylon* foi estudada durante a sua decomposição em quatro diferentes tipos de solo. A toxicidade dos extratos foi estimada pela medida dos efeitos da germinação e crescimento de *Lactuca sativa*, após 1, 7, 15, 30, 180 e 365 dias de decomposição em cada solo. Os resultados indicam que os resíduos *Acacia menoxylon* produzem elevado efeito inibitório no início da decomposição. Esta toxicidade parece afetar a germinação na fase inicial mais que na final, o maior efeito está sobre o crescimento (GONZÁLEZ; SOUTO; REIGOSA, 1995).

O lixiviado das folhas de *Acacia auriculiformis* foi coletado por embebição de 200 g de folhas secas extraídas em água por 4, 8, 12 e 24 horas. O filtrado obtido foi utilizado na germinação de sementes de arroz. A germinação, crescimento e a matéria seca acumulada da plumula e radícula diminuíram com o aumento do período de embebição (JADHAV & GAYNAR, 1992).

Extratos das cascas e folhas de *Acacia nilotica* inibiram a germinação de algodão, girassol, beringela, tomate e pimenta. O crescimento da radícula e da plumula também foram afetados. O inibição do extrato das cascas foi maior que o extrato das folhas. O extrato das cascas apresenta taninos como aleloquímicos (SWAMINA; RAI; SURESH, 1989).

Bioensaios com folhas e flores de *Acacia dealbata* e com solos coletados abaixo da planta, foram realizados para verificar a germinação e crescimento da raiz e hipocótilo de *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Phleum pratense* e *Lolium perenne*. Ambos, material vegetal e solo demonstraram forte inibição. Os compostos identificados nos extratos incluem: ácido *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico, gentísico, *p*-cumárico, cafeico e ferúlico (BHASKAR & DASAPPA, 1986).

REIGOSA; CASAL; CARBALLEIRA, 1984, testaram a fitotoxicidade de extrato de solos abaixo de *Acacia dealbata* durante a floração, verificando efeito sobre a germinação e crescimento de *Trifolium repens* e *Lolium perenne*. Os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, genístico, *p*-cumárico e ferúlico foram identificados como os aleloquímicos.

CHOU, 1980, pesquisando a vegetação subtropical de Taiwan, verificou que *Acacia confusa* apresentou forte efeito alelopático. E identificou as toxinas na espécie estudada como: ác. ferúlico, *p*-cumárico, siríngico, vanílico, *p*-hidroxibenzóico e *o*-hidroxifenilacético.

Segundo KITOU, 1999, o extrato aquoso de *Acacia pubescens* inibiu a germinação de sementes de *Lactuca sativa*.

O extrato das folhas de *Acacia senegal* apresenta potencial efeito alelopático, contendo substâncias que inibem a germinação de sementes de gergelim, e retardam o desenvolvimento da planta quando aplicado em concentrações maiores que 5% (FADL, 1997).

Extratos aquosos de folhas, raízes, inflorescências e solos ao redor de *Acacia tortilis*, testados em várias diluições inibiram o crescimento de *Pennisetum glaucum* (ANURAG; SHARMA; SAXENA, 1996).

*Acacia xanthopholea* produz substâncias com potencial efeito alelopático sobre *Zea mays* (milho) (NSOLOMO; MRECHA; MAGHEMBE, 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL:

As flores e folhas de *Acacia longifolia* foram coletadas respectivamente em setembro de 2001 e maio de 2002, no Campus do Setor de Ciências da Saúde, Sede Botânico, da Universidade Federal do Paraná, situado no município de Curitiba, PR.

A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Gerdt Hatchbach do Museu Botânico Municipal (MBM) da Prefeitura de Curitiba. Uma exsicata encontra-se depositada neste museu sob o número de registro 261.856.

#### 3.2 ESTABILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Flores e folhas de *Acacia longifolia* foram secas e estabilizadas a temperatura ambiente. O material vegetal foi moído e armazenado em recipientes hermeticamente fechados e ao abrigo da luz e umidade.

#### 3.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES

No preparo do extrato etanólico, foram utilizadas 150 g de material. Este foi submetido a uma extração por refluxo com 5 litros de etanol, por 6 vezes consecutivas de 20 minutos de ebulição. A cada término de refluxo o extrato foi filtrado e o líquido concentrado em evaporador rotatório. No final dos 6 refluxos, os filtrados concentrados foram reunidos, resultando em um volume final de 125 ml.

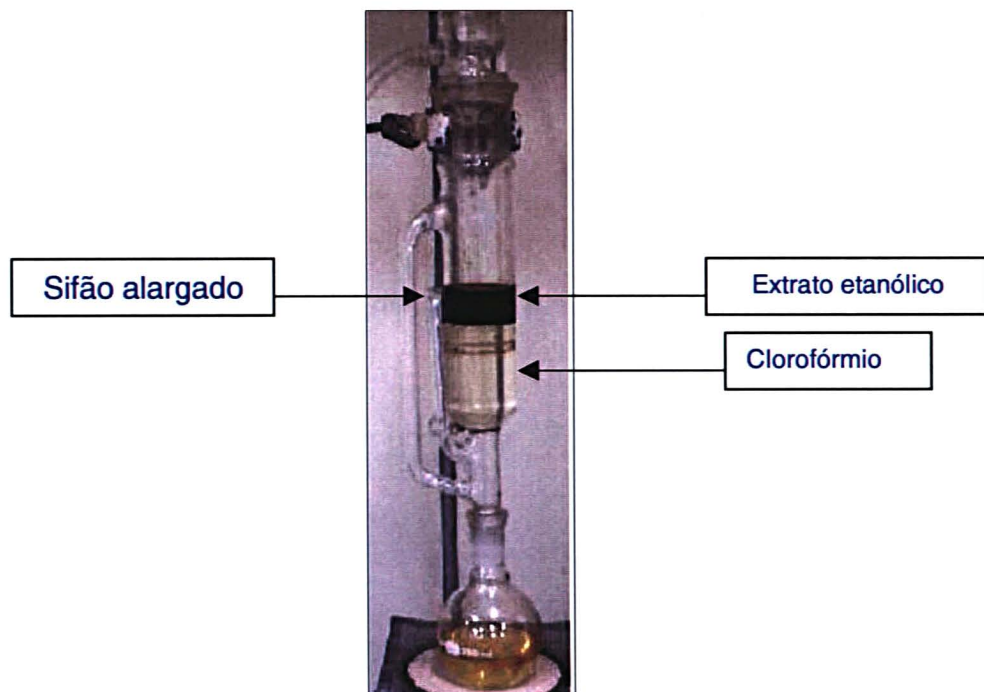
O filtrado concentrado permaneceu no freezer por 24 horas, havendo formação de um precipitado, o qual foi filtrado e reservado.

### 3.4 SEPARAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES

O extrato etanólico das flores, após concentração e eliminação do álcool, passou por um processo de partição, com solventes orgânicos imiscíveis em água, em polaridade crescente; hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Assim foi realizada uma partição líquido - líquido em funil de separação com o extrato etanólico, utilizando hexano até a exaustão. Em seguida, o extrato foi fracionado com clorofórmio em extrator líquido-líquido. Neste extrator o sifão apresenta um alargamento no topo evitando o sifonamento do extrato, desta forma a extração ocorre de maneira contínua, com o escoamento paulatino do clorofórmio. Neste sistema a quantidade de clorofórmio utilizada no processo de extração é menor que a utilizada em funil de separação. No momento em que observou-se que o clorofórmio permaneceu incolor, encerrou-se a extração.

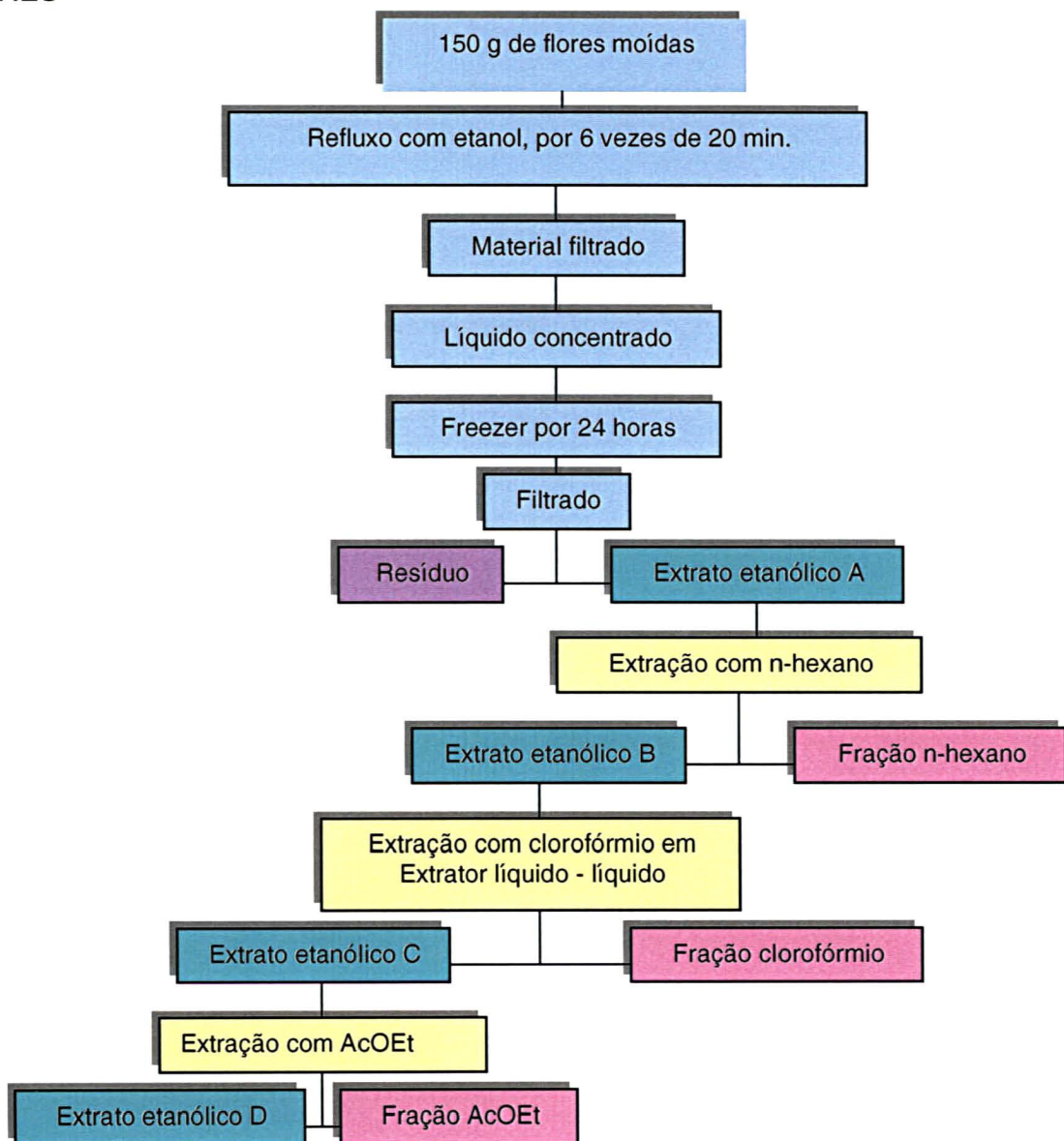
FIGURA 3 – EXTRATOR LÍQUIDO - LÍQUIDO



Em seguida o extrato etanólico foi fracionado em funil de separação com acetato de etila até a exaustão. Todas as frações foram concentradas em evaporador rotatório até a secura.

Os extratos obtidos foram destinados aos ensaios alelopático e antimicrobianos. A fração AcOEt foi utilizada para o isolamento de substâncias.

FIGURA 4 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES



### 3.5 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES

A fração acetato de etila, foi submetida a CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) semi-preparativa, equipamento Merck Hitachi (HPLC System Manager Report) com modulo de interface D-7000; detector L-7450 DAD; bomba L-7100 com quatro estágios gradientes; degaseificador de solvente L-7612, utilizando coluna preparativa Lichrospher<sup>R</sup> RP 18, 250 x 10 mm - 10 µm.

Uma solução de 70 mg/ml do extrato AcOEt em metanol foi preparada e foram aplicados 70 µl da solução por vez no aparelho, resultando 4,9 mg de extrato por aplicação. Durante 2 dias foram realizadas 20 aplicações, resultando num total de 1400 µl de solução injetados, e em uma massa utilizada de 98 mg de extrato AcOEt.

Os solventes utilizados para a separação foram:

- Solvente A: Água: Metanol ( 90:10)
- Solvente B: Metanol: Água (90:10)

A vazão dos eluentes foi de 5 ml/min e o sistema gradiente linear empregado encontra-se descrito na tabela 2:

TABELA 2 – SISTEMA GRADIENTE EMPREGADO NA CLAE

Tempo (minutos)	Solvente A	Solvente B
0 - 5,0	60,0	40,0
15,0	40,0	60,0
20,0	20,0	80,0
21,0	0,0	100,0

A faixa de detecção no ultravioleta foi de 210 a 450 nm, onde puderam ser observados seis picos principais:

FIGURA 5 - PICOS PRINCIPAIS NO ULTRAVIOLETA

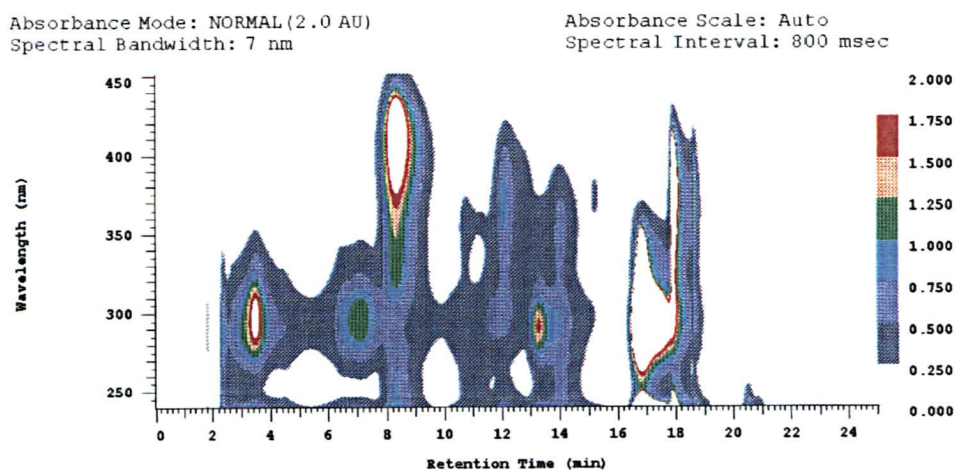
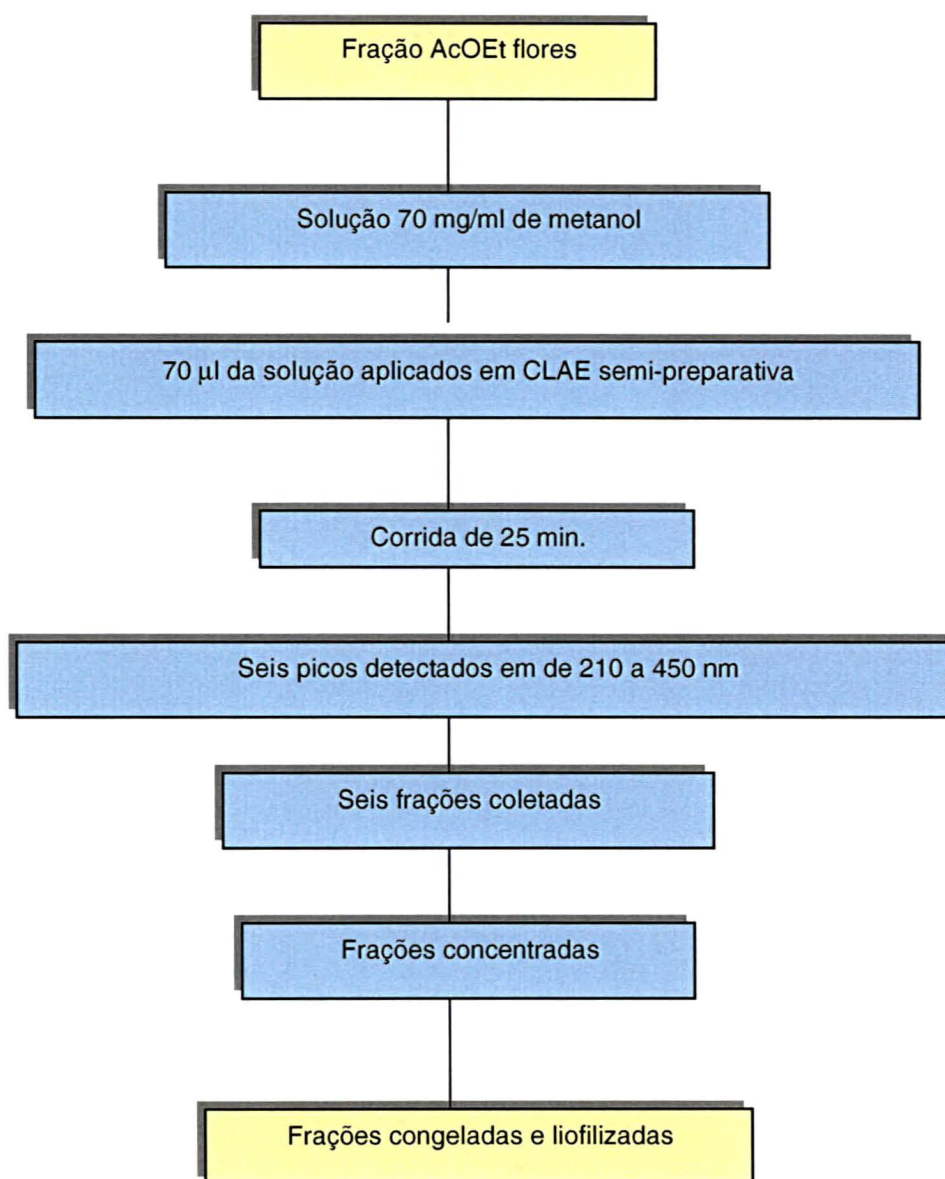


TABELA 3 – PRINCIPAIS FRAÇÕES SEPARADAS NO CLAE

Número	Tempo de Retenção
01	3,45
02	7,16
03	8,29
04	11,97
05	13,21
06	16,7

As seis frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório até a retirada completa do metanol. Após as mesmas foram congeladas e liofilizadas.

FIGURA 6 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DA FRAÇÃO AcOEt



### 3.6 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES

Por meio de cromatografia em camada delgada em Sílica Gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando duas fases móveis; AcOEt: água: ác. fórmico (90: 05: 05) e AcOEt: MeOH: água (15:08:02) e dois reveladores; vanilina sulfúrica e NEU, determinou-se que as frações com tempo de retenção 3,45 e 8,29 minutos apresentavam substâncias ainda não relatadas na fração AcOEt das flores.

A fração com tempo de retenção de 3,45 minutos apresentou após liofilização 13,5 mg de um sólido amarelo claro, e a fração com tempo de retenção de 8,29 minutos apresentou 9,5 mg de um sólido amarelo escuro. Separou-se 1 mg de cada composto para realizar análise no ultravioleta segundo (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970), para verificar os deslocamentos provocados pelos reagentes: NaOMe, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl, na faixa de absorção de 200 a 500 nm. Os espectros foram registrados em espectrofotômetro UV/ visível UV 1601 PC Spectrophotometer Shimadzu.

O restante do material foi destinado a análise espectroscópica de <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN, realizados em equipamento Varian, frequência de 300 e 75 MHz, respectivamente, utilizando como solvente metanol deuterado.

Após análise dos espectros de UV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN foi verificada a impossibilidade da identificação da fração coletada em 3,45 min, e que o composto AC3 (tempo de retenção 8,29 min.) apresentava uma porção osídica.

Sendo assim o composto AC3 foi submetido a uma hidrólise, utilizando 30 ml de HCl 10%, e deixando em refluxo por 30 minutos. Após o resfriamento o líquido foi lavado por 3 vezes de 15 ml, em funil separação, com solução de AcOEt: clorofórmio (50:50), para extrair a genina. A fração aquosa foi concentrada em evaporador rotatório utilizando isopropanol como fator de redução do ponto de ebulição da água. Após foi realizada uma CCD em Sílica Gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando a fase móvel clorofórmio: MeOH (60:40), amostras autênticas de glicose e galactose, a fase aquosa concentrada e anisaldeído como revelador, para verificar qual o açúcar estaria ligado ao flavonóide.

### 3.7 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS

O estudo fitoquímico das folhas consistiu na pesquisa de óleo volátil e dos principais grupos químicos presentes.

#### 3.7.1 PESQUISA DE ÓLEO VOLÁTIL

Para a pesquisa de óleo volátil foram utilizadas 200 g de folhas moídas. Estas foram submetidas a extração por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger, durante 6 horas.

#### 3.7.2 PESQUISA DOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS

Para o estudo dos principais grupos químicos das folhas foi utilizada a marcha sistemática de MOREIRA (1979) com algumas adaptações.

##### 3.7.2.1 EXTRATO AQUOSO A 20%

Para o preparo do extrato aquoso 50 g de folhas foram macerados em 250 ml de água destilada em banho de água a 70°C por 2 horas, em frasco aberto.

O material foi filtrado e o líquido utilizado para a pesquisa de:

- a) heterosídeos antociânicos: são pigmentos que se comportam como indicadores ácido - base, variando de cor conforme o pH do meio. Para a reação 15 ml do extrato aquoso foram distribuídos em três tubos de ensaio, um deles foi alcalinizado com NaOH a 10% e pH 10, outro acidificado com HCl 10% a pH 1 enquanto o terceiro foi neutralizado. O desenvolvimento de coloração indica reação positiva.
- b) saponinas: os três tubos anteriores foram agitados energicamente por 5 minutos, repousando por 30 minutos. O resultado é considerado positivo, caso após o repouso a espuma esteja em altura superior a 1 cm.
- c) taninos: os reativos utilizados para caracterizar foram cloreto férrico 1% (forma coloração azul quando positivo), solução de gelatina 2,5% (forma precipitado), cloridrato de emetina 1% (forma precipitado), sulfato de ferro amoniacal (coloração azul) e acetato de chumbo (precipitado).

### 3.7.2.2 EXTRATO ALCOÓLICO A 20%

Para o preparo do extrato alcoólico 50 g de folhas foram macerados em 250 ml de etanol em banho de água a 70°C por 2 horas, em frasco aberto.

O filtrado concentrado permaneceu na geladeira por 24 horas, havendo formação de um precipitado, o qual foi filtrado e reservado.

O extrato hidroalcoólico das folhas passou por um processo de partição, com solventes orgânicos imiscíveis em água, em polaridade crescente; hexano, clorofórmio e acetato de etila. Assim foi realizada uma partição líquido - líquido em funil de separação com o extrato hidroalcoólico, utilizando hexano até a exaustão, seguido de clorofórmio e acetato de etila.

Quatro extratos foram obtidos: hexano, clorofórmico, acetato de etila e hidroalcoólico remanescente. Nestes extratos foram realizadas pesquisas de:

- a) alcalóides: os reativos utilizados foram Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand, a formação de precipitado ou turvação indica reação positiva.
- b) leucoantocianidinas: 10 ml de cada extrato foram reduzidos a 5 ml em cápsula de porcelana, foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecido até a ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.
- c) heterosídeos flavônicos: 20 ml de cada extrato foram levados a secura e recuperados e 5 ml de etanol, adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio e 2 ml de HCl concentrado. O desenvolvimento de colorações amarelas, vermelhas e violetas indicam reação positiva.
- d) flavonóides: 10 ml de cada extrato foram reduzidos à secura, ao resíduo foram adicionados 5 gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e oxálico (1:1), e após 5 ml de éter etílico. A presença de fluorescência no U.V. (365 nm) indica a presença de flavonóides.
- e) cumarinas: em papel de filtro foram feitos 3 pontos de cada extrato, a 2 pontos foram adicionadas 1 gota de NaOH 1 N, uma destas manchas foi coberta com papel alumínio, e o papel deixado em exposição no ultravioleta

por 15 minutos. O aparecimento de fluorescência azul na mancha alcalinizada e descoberta indica reação positiva.

- f) antraquinonas: foram reduzidos 5 ml de cada extrato a secura e recuperados em 30 ml de etanol, adicionou-se 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%, deixou-se por 30 min. em refluxo, seguido de filtração. Após esfriar, o filtrado foi extraído duas vezes com éter etílico, foram adicionados 5 ml de solução de NH<sub>4</sub>OH. No caso de reação positiva ocorre o desenvolvimento de coloração rósea.
- g) esteróides e ou triterpenos: 30 ml do extrato hexânico e clorofórmico foram evaporados e recuperados em 5 ml de clorofórmio e em seguida filtrados. Adicionou-se a 2 ml do filtrado 1 ml de anidrido acético e 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado lentamente. A formação de coloração rósea, azul, verde ou amarela indica reação positiva.

### 3.8 ISOLAMENTO DA NARINGENINA

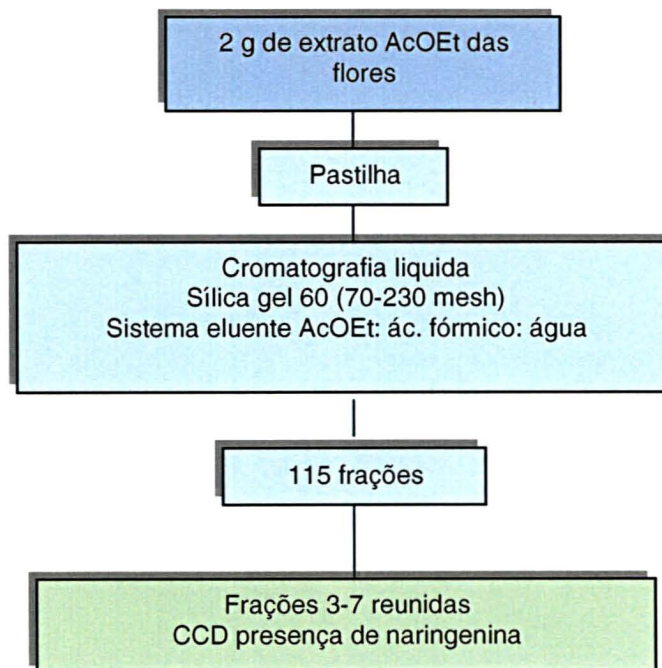
A presença da flavanona naringenina em flores de *Acacia longifolia* foi descrita por MARINI-BETTOLO e FALCO (1951), também por KERBER (1993) e por SILVA (2001).

Por meio de cromatografia em camada delgada foi verificada a presença de naringenina nas frações clorofórmio e AcOEt das flores. Procedeu-se então ao isolamento para aplicação no ensaio alelopático.

Para isso foi preparada uma pastilha com 2 g de extrato acetato de etila das flores, dissolvendo o extrato em metanol e incorporando em pequenas quantidades de sílica gel 60 (70 - 230 mesh). O líquido foi evaporado sob constante homogeneização e leve aquecimento até a obtenção de um pó fino e seco. Com a pastilha foi realizada uma cromatografia em coluna (30x3 cm), com 40 g de sílica gel 60 (70 - 230 mesh), utilizando como solvente inicial AcOEt, seguido de AcOEt: ác. fórmico: água (98:01:01) até o gradiente AcOEt: ác. fórmico: água (20: 40: 40). Foram coletadas 115 frações de 10 ml. Nas frações 3 a 7 ocorreu a formação de cristais na parede do frasco, os quais

por meio de CCD, utilizando amostra autêntica de naringenina, duas fases móveis; clorofórmio: AcOEt: ác. fórmico (5: 3: 1) e AcOEt: MeOH (4:1) e dois nebulizadores; vanilina sulfúrica e NEU, foram identificados como cristais de naringenina.

FIGURA 7 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO DA NARINGENINA



### 3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

#### 3.9.1 TESTE DO CRESCIMENTO

Para o ensaio foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa*, popularmente conhecida como alface, classe fiscalizada, cultivar Babá e com 99% de germinação detectados por meio de teste padrão de germinação.

Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa*, de acordo com as recomendações bibliográficas mais usuais para o teste. As sementes referidas são pequenas e com grande área superficial, viabilizando o processo de germinação, não requerendo nenhuma manipulação. Outras sementes poderiam ser utilizadas para o mesmo tipo de ensaio, como as de tomate, trigo, arroz e sorgo, entre outras.

Folhas de papel Whatman número 6 colocadas em placa de Petri, foram embebidas com 1 ml das soluções de naringenina e dos extratos das flores e folhas, conforme concentração demonstrada abaixo:

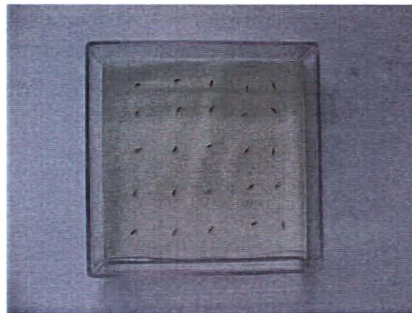
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES SUBMETIDAS AO TESTE DE CRESCIMENTO

Fração Hexano Flores solução g/ml	Fração Clorofórmio Flores solução g/ml	Fração AcOEt Flores solução g/ml	Extrato Bruto Folhas g/ml	Naringenina g/ml
0,005	0,005	0,01	0,005	0,005
0,01	0,01	0,02	0,01	-
0,02	0,04	0,04	0,02	-
0,05	0,07	0,08	0,05	-

O conjunto foi submetido a secagem em estufa a 40 °C de temperatura por um período de 12 horas. Após a evaporação do solvente, os papéis de filtro correspondentes a cada diluição foram colocados em caixas Gerbox.

Na seqüência foram adicionados 3 ml de água destilada e distribuídas 25 sementes em cada caixa, respectivamente em 4 repetições consecutivas.

FIGURA 8 - CAIXA GERBOX COM 25 SEMENTES

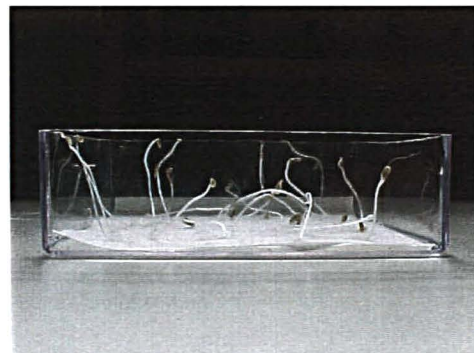
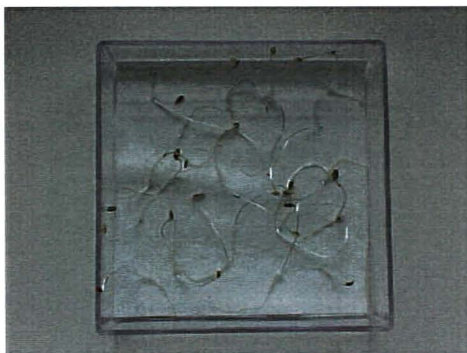


Após a semeadura, as caixas Gerbox foram submetidas a condições ideais em um germinador Mangelsdorf, marca Biomatic, previamente regulado a uma temperatura de 17°C, com limites mínimo 16,8 °C e máximo de 17,2°C. Não foi necessário fotoperíodo, uma vez que não há exigência da espécie.

Em paralelo houve a germinação de 25 sementes nas mesmas condições, como controle. Todos os ensaios foram realizados em 4 repetições consecutivas.

Decorridos 7 dias, foi realizada a leitura em papel milimetrado dos comprimentos da radícula (origina a raiz) e do hipocótilo (origina o caule) respectivamente.

FIGURA 9 - CAIXA GERBOX APÓS 7 DIAS DE GERMINAÇÃO



### 3.9.2 TESTE DE GERMINAÇÃO

Para a análise da atividade alelopática, além do teste de percentagem de crescimento foi utilizado também o teste de germinação. Neste ensaio, foram verificadas diariamente quantas sementes germinaram na presença do extrato ou da substância em análise, em comparação com um controle contendo somente água. Desta forma, averiguou-se se o extrato inibe ou estimula a germinação das sementes.

No experimento foram realizadas 4 repetições consecutivas com 25 sementes de *Lactuca sativa*. O mesmo procedimento de preparo e incubação utilizado no teste de percentagem do crescimento foi realizado. Em paralelo promoveu-se a germinação de 25 sementes nas mesmas condições de temperatura e umidade, como controle.

Utilizou-se 1 ml das soluções de naringenina e dos extratos das flores e folhas, conforme concentrações respectivas abaixo:

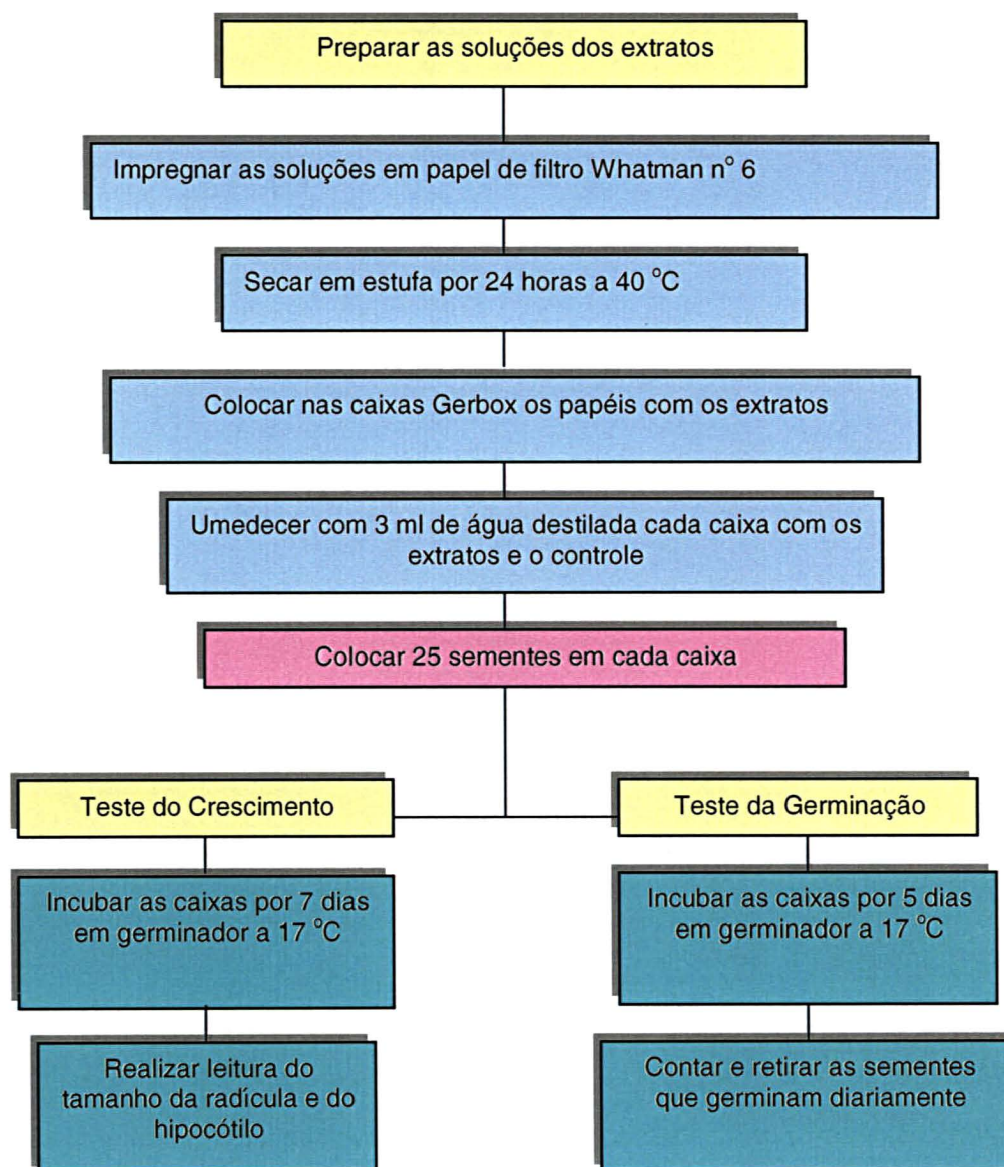
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES SUBMETIDAS AO TESTE DE GERMINAÇÃO

Fração Hexano Flores solução g/ml	Fração Clorofórmio Flores solução g/ml	Fração AcOEt Flores solução g/ml	Extrato Bruto Folhas g/ml	Naringenina g/ml
0,005	0,005	0,01	0,005	0,005
0,01	0,01	0,02	0,01	-
0,02	0,04	0,04	0,02	-
0,05	0,08	0,08	0,05	-

Diariamente, durante o período de 5 dias consecutivos, foi realizada a leitura da germinação nas respectivas concentrações dos extratos, da naringenina e do controle.

Os resultados foram submetidos à análise de acordo com a germinação do grupo controle.

FIGURA 10 - ESQUEMA DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA



### 3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a avaliação da atividade antibacteriana das folhas de *Acacia longifolia* foi utilizado o método da difusão em gel. Extratos da planta foram incorporados em discos de papel, e foi verificada a inibição sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11129) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) pela formação de halo de não crescimento ao redor dos discos impregnados.

#### 3.10.1 PREPARO DOS EXTRATOS

Para o preparo do extrato bruto etanólico, 100 g de folhas de *Acacia longifolia* foram maceradas por 7 dias em 300 ml de etanol. Após o material foi filtrado e o líquido concentrado em evaporador rotatório até *secura*.

Outro extrato destinado à partição foi preparado, 150 g de folhas de *Acacia longifolia* foram maceradas por 7 dias em 400 ml de etanol. O material foi filtrado e o líquido concentrado a 70 ml. O filtrado permaneceu na geladeira por 24 horas, formou-se um precipitado que foi filtrado e reservado. Após o extrato etanólico passou por um processo de partição realizado em funil de separação com a seqüência de solventes: hexano, clorofórmio, AcOEt. Todas as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, inclusive o extrato etanólico remanescente.

#### 3.10.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Na primeira etapa do estudo antimicrobiano foram testadas cinco concentrações dos extrato bruto etanólico nas três cepas bacterianas. Verificada a presença de halo de inibição em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram testadas as frações precipitado, hexano, clorofórmio, AcOEt e extrato etanólico remanescente.

O extrato bruto etanólico foi dissolvido em etanol, 0,1 g em 8 ml de solvente, 10, 20, 40, 80 e 160 µl desta solução foram impregnados em discos de papel estéreis, resultando respectivamente em 125, 250, 500, 1000 e 2000 µg por disco.

As frações precipitado, hexano, clorofórmio, AcOEt foram dissolvidas em etanol e extrato etanólico remanescente foi dissolvido em etanol 70%. A concentração em cada fração por disco foi de 1000 µg.

Discos de controle dos solventes foram preparados impregnando 80 µl de etanol e etanol 70%. Os discos contendo os extratos, frações e controle de solventes permaneceram em câmara de fluxo laminar até secagem completa dos líquidos.

### 3.10.3 PREPARO DO INÓCULO

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11129) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram repicadas em ágar Mueller Hinton e incubadas à 35 °C por 24 horas.

Uma suspensão de cada bactéria foi preparada em 10 ml de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo número 5 da escala Mac Farland (0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> a 1% em 9,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%).

Um Swab estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana, retirou-se o excesso de líquido pressionando o Swab contra as paredes do tubo.

O Swab foi esfregado na superfície de cada placa de Petri contendo o meio ágar Mueller Hinton em várias direções.

#### 3.10.4 TESTE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os discos impregnados com o extrato bruto etanólico nas cinco concentrações foram colocados com o auxílio de um pinça estéril nas placas inoculadas com as bactérias. No centro de cada placa foi colocado um disco de cloranfenicol 30 µg como controle positivo de inibição.

Os testes foram realizados em triplicata para cada microorganismo. As placas foram incubadas na estufa a 35 °C por 24 horas. Após este período as placas foram retiradas da estufa e os halos de inibição foram medidos.

Verificada a presença de halo de inibição nas placas contendo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi realizado novo ensaio com os discos com as frações precipitado, hexano, clorofórmio, AcOEt e extrato etanólico remanescente, incubando as placas na estufa a 35 °C por 24 horas.

Foram realizados controle de esterilidade do meio e dos discos de papel. Também foram realizados para cada microorganismo controle dos solventes utilizados.

### 3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

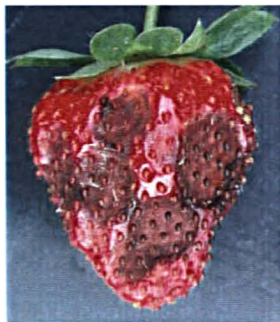
Para avaliar a atividade antifúngica dos extratos acetato de etila das flores e extrato bruto etanólico das folhas de *Acacia longifolia* foi utilizado o método de incorporação dos extratos em meio de cultura BDA ágar batata dextrose adaptado de AUER & BETTIOL, 1986 e de STANGARLIN *et al.*,1999. O ensaio foi realizado no sentido de avaliar o efeito dos extratos sobre o crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum* (café), *Colletotricum acutatum* (morango), *Cylindrocladium spathulatum* (erva-mate). Estes fungos são considerados fitopatogênicos em diversas culturas econômicas.

O *Fusarium oxysporum* é um fungo fitopatogênico para diversas culturas, como banana, maçã, tomate, flores ornamentais entre outras, causando muito prejuízo na agricultura mundial.

O *Colletotricum acutatum* é o agente causador da antracnose em culturas de morango, provocando pontos castanhos nos frutos e necrose das raízes.

O *Cylindrocladium spathulatum* é o agente causador da pinta-preta em culturas de erva-mate, provocando manchas foliares e queda das folhas.

FIGURA 11 - MORANGO COM ANTRACNOSE



Fonte: <http://strawberry.ifas.ufl.edu/plantpathfiles/diseasegallery.htm#Colletotrichum%20acutatum>

### 3.11.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para o ensaio foram utilizados a fração AcOEt das flores e o extrato bruto etanólico das folhas, o mesmo utilizado na avaliação da atividade antibacteriana.

Foram dissolvidos 500 mg da fração AcOEt das flores e do extrato bruto etanólico das folhas em 500 ml de água destilada, obtendo-se uma concentração de 1000 ppm para cada.

### 3.11.2 TESTE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O meio BDA foi incorporado nesta diluição, o conjunto foi autoclavado a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. Após o meio foi vertido em placas de Petri estéreis de 15 cm de diâmetro em câmara de fluxo laminar.

Para avaliar possível contaminação microbiológica do meio, este foi incubado a 25 °C por 48 horas. Passado este período, verificado que não houve contaminação microbiana, foram colocados no centro das placas discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados de culturas puras de 7 dias de idade dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum acutatum* e *Cylindrocladium spathulatum*. As placas foram vedadas com filme plástico.

As placas com *Fusarium oxysporum* e *Colletotricum acutatum* foram incubadas por 24 °C no escuro e as contendo *Cylindrocladium spathulatum* a 22 °C, também no escuro.

Para o controle foi realizada a cultura dos fungos em meio BDA, sem extrato, nas mesmas condições para cada patógeno. Foram realizadas 7 repetições para cada fungo com os extratos no meio BDA e 7 repetições contendo o fungo e o meio BDA.

A leitura foi realizada quando o crescimento micelial atingiu quase a totalidade do meio de cultura. A avaliação foi feita medindo-se o diâmetro de crescimento (média de duas perpendiculares) de cada placa. Comparou-se as medidas do controle com as dos extratos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FLORES

#### 4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA PRESENTE NA FRAÇÃO AC3

Na CLAE semi-preparativa realizada com a fração acetato de etila das flores de *Acacia longifolia*, foi isolada a substância AC3 com o tempo de retenção 8,29 min.

Para a identificação da substância foram realizados espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de absorção no ultravioleta com uma solução de 1 mg/100ml em MeOH, segundo MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B., 1970, aonde foram verificados os deslocamentos provocados pelos reagentes: NaOMe, NaOAc, NaOAc /  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$  / HCl, na faixa de absorção de 200 a 500 nm. A tabela abaixo apresenta as principais absorções da solução metanólica da substância AC3 e o resultado da adição dos reativos:

TABELA 6 - PRINCIPAIS  $\lambda$  NO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA AC3

Reagente	$\lambda$ nm
MeOH	274, 406
NaOMe	281, 341, 454
$\text{AlCl}_3$	287, 317, 446
$\text{AlCl}_3/\text{HCl}$	276, 317, 402
NaOAc	324, 406
NAOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$	282, 328, 426

O espectro de UV em metanol (*fig.13*) com  $\lambda$  max. a 406 nm ( $\log \epsilon = 4,37$ ) e ombro em 274 nm ( $\log \epsilon = 3,86$ ) indica a presença de flavonóide tipo aurona, pois a banda de absorção máxima para auronas ocorre na região de 370 - 430 nm. Isto também se confirma pela presença de um sinal simples a 6,65 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  RMN correspondente ao próton na posição 8 (*fig.14*). Em outros tipos de flavonóides com próton de ligação dupla como as isoflavonas e as flavonas a região é em torno de 7,50 ppm e abaixo de 6,50 ppm (respectivamente).

O deslocamento batocrômico 48 nm provocado pela adição de NaOMe (*fig.15*) indica a presença de hidroxila em C6 e C4'. O deslocamento batocrômico de 44 nm pela adição de  $\text{AlCl}_3$  com retorno a posição original pela adição de HCl a esta solução indica a presença de grupamento orto-di-hidroxi no anel B. O deslocamento batocrômico de 20 nm pela adição de NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  a solução metanólica também confirma a presença de grupamento orto-di-hidroxi no anel B.

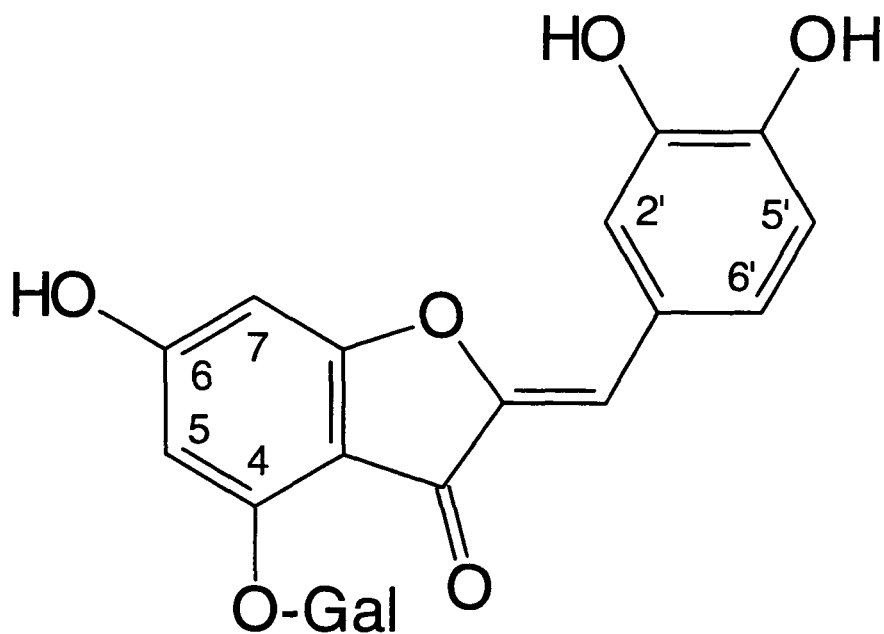
A presença de um dubleto a 6,82 ppm ( $J = 8$  Hz) *fig. 16*, um dubleto a 7,50 ppm ( $J = 1$  Hz) e um duplo dubleto a 7,20 ppm ( $J = 1, 8$  Hz) confirma a existência de dois substituintes em orto no anel B, sendo que os três prótons estão, dois em orto ( $J = 8$  Hz, H5' e H6') e o terceiro próton H2' encontra-se em posição meta ao próton H6' ( $J = 1$  Hz).

O congestionamento de sinais entre 3,40 e 3,60 ppm, o duplo dubleto a 3,75 ppm ( $J = 12, 2$  Hz), o dubleto a 3,90 ppm ( $J = 12$  Hz) e o dubleto a 5,00 ppm ( $J = 7,5$  Hz) indicam a presença de uma porção osídica. A presença de dois singletos em 6,30 e 6,35 ppm indicam prótons em 5 e 7 os quais, embora devesses apresentar-se como dubletos com  $J \sim 1$  Hz, acoplamento em meta, surgem como sinais ligeiramente alargados. A única forma de que estes sinais surgissem como singletos simples seria se estivessem em *p* porém, neste caso, surgiriam entre 7 e 8 ppm (segundo MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970). A ausência de sinal indicando a presença de um próton na posição 4 indica que a porção osídica ocupa esta posição.

Por meio da hidrólise da auroa, e posterior análise por cromatografia em camada delgada, utilizando amostras autênticas de glucose e galactose, foi verificada a presença desta última.

Sendo assim, propõe-se que a auroa em questão trata-se da 4-*O*-galactosil aureusidina. A presença deste flavonóide nunca havia sido mencionada em flores de *Acacia longifolia*.

FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-*O*-GALACTOSIL AUREUSIDINA



A tabela 7 relaciona os valores dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , da 4-O-galactosil aureusidina

TABELA 7 - : DADOS DE ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$

Posição	$^1\text{H}$ RMN (ppm)	J (Hz)	$^{13}\text{C}$ RMN (ppm)
2			148,01
3			182,2
3 a			149,35
4			171,81
5	6,30 bs		99,48
6			170,07
7	6,35 bs		94,12
7 a			167,66
8	6,65 s		113,96
1'			125,46
2'	7,50 d	1	118,86
3'			146,84
4'			158,19
5'	6,82 d	8	116,80
6'	7,20 dd	1, 8	126,30
1"	5,00 d	7,5	101,82
2"	3,40-3,60 m		78,52
3"	3,40-3,60 m		77,43
4"	3,40-3,60 m		74,25
5"	3,40-3,60 m		71,32
6" $\alpha$	3,75 dd	12, 2	62,49
6" $\beta$	3,90 d	12	62,49

No espectro de correlação H-C tipo HMQC, os carbonos, 5 e 7, do anel A, correspondem a 99,48 e 94,12 ppm. O carbono 8 (=CH-) corresponde a 113,96 ppm, e os carbonos do anel B, 2', 5', 6' correspondem aos valores 118,86, 116,80 e 126,30, respectivamente.

De acordo com AGRAWAL & RASTOGI, 1981, quando a posição 4' do anel B está com uma OH presente, as posições 7 a, 3 a, 3, 2, 1' e 4', podem assumir os valores de carbono de 167,66, 149,35, 182,2, 148,01, 125,46, 158,19, respectivamente. O valor do carbono da carbonila em 182,2, confirma que o composto em questão é uma aurona.

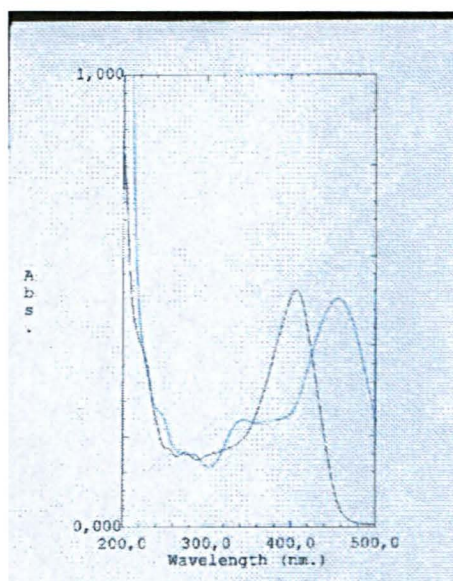
Segundo SEABRA *et al.*, 1997, a posição 3' pode assumir valores em torno de 146,84.

Os valores de carbono em torno de 148 ppm para a posição 2, normalmente indicam uma *E*-aurona, porém nestes casos o valor de carbono da posição 8 (=CH-), aumenta em torno de 10 ppm, resultando valores entre 119 a 122 ppm. Na aurona em questão o valor da posição 8 pelo espectro de correlação de H-C HMQC, corresponde a 113,86, indicando que possivelmente trata-se de uma *Z*-aurona. A maioria das auronas apresentam configuração *Z*-oleofina (PELTER; WARD; HELLER, 1979) (SIMÕES *et al.*, 2000).

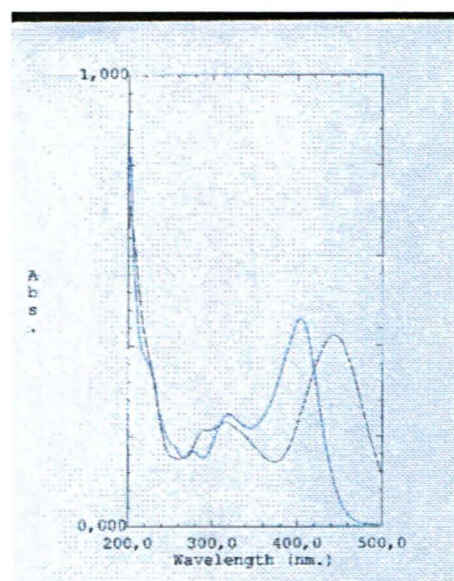
Os valores 101,82, 78,52, 77,43, 74,25, 71,32 e 62,49 correspondem aos carbonos 1", 2", 3", 4", 5" e 6" do açúcar, respectivamente. Pelo espectro de correlação H-C HMQC, observa-se que existem seis pontos na região correspondente ao açúcar, indicando a presença de apenas um tipo de açúcar na estrutura.

Os valores 54,95 e 54,84 ppm, correspondem a metoxila do metanol utilizado, não fazendo parte da estrutura do composto.

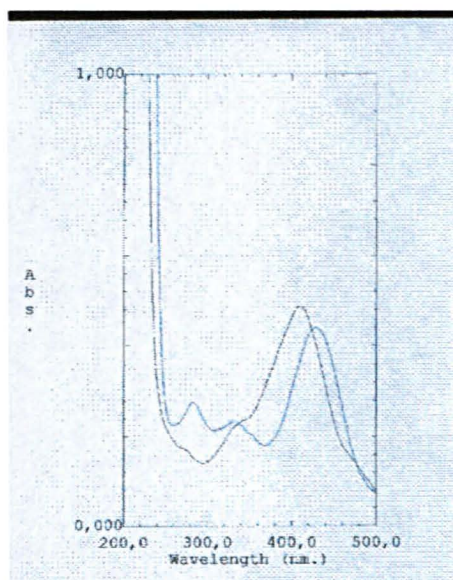
FIGURA 15 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA LUZ UV DA SUBSTÂNCIA AC3



Legenda: MeOH \_\_\_ NaOMe \_\_\_



Legenda: AlCl<sub>3</sub> \_\_\_ AlCl<sub>3</sub>/HCl \_\_\_



Legenda: NaOAc \_\_\_ NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> \_\_\_



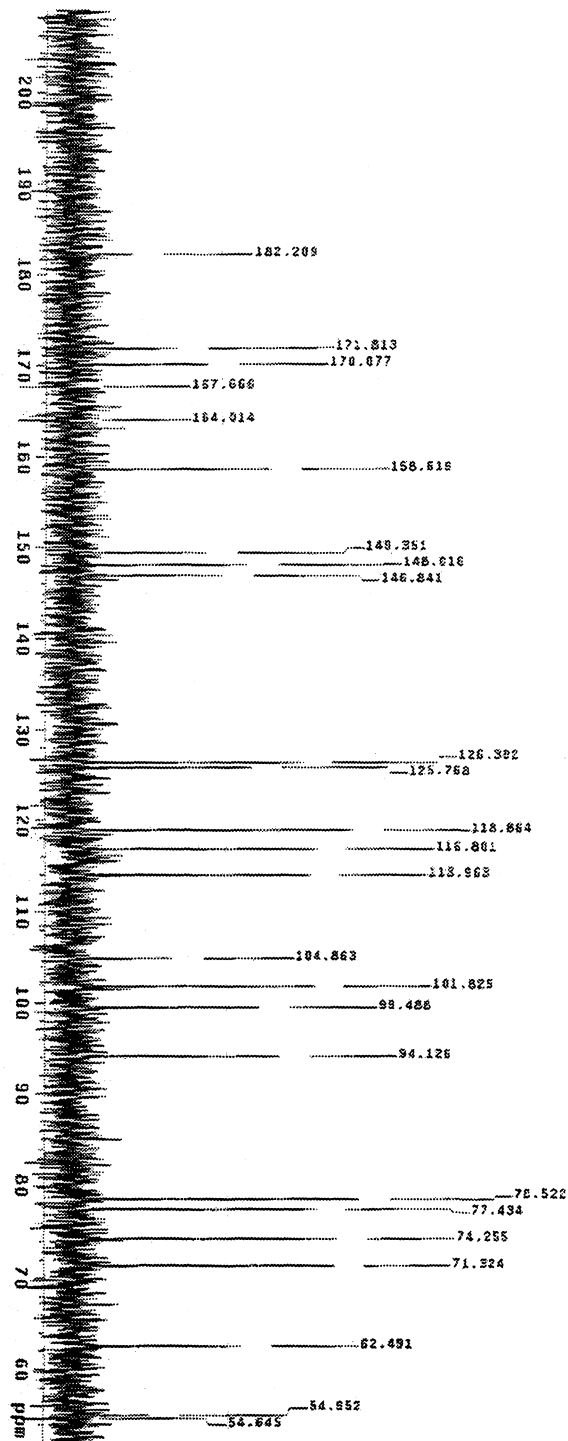
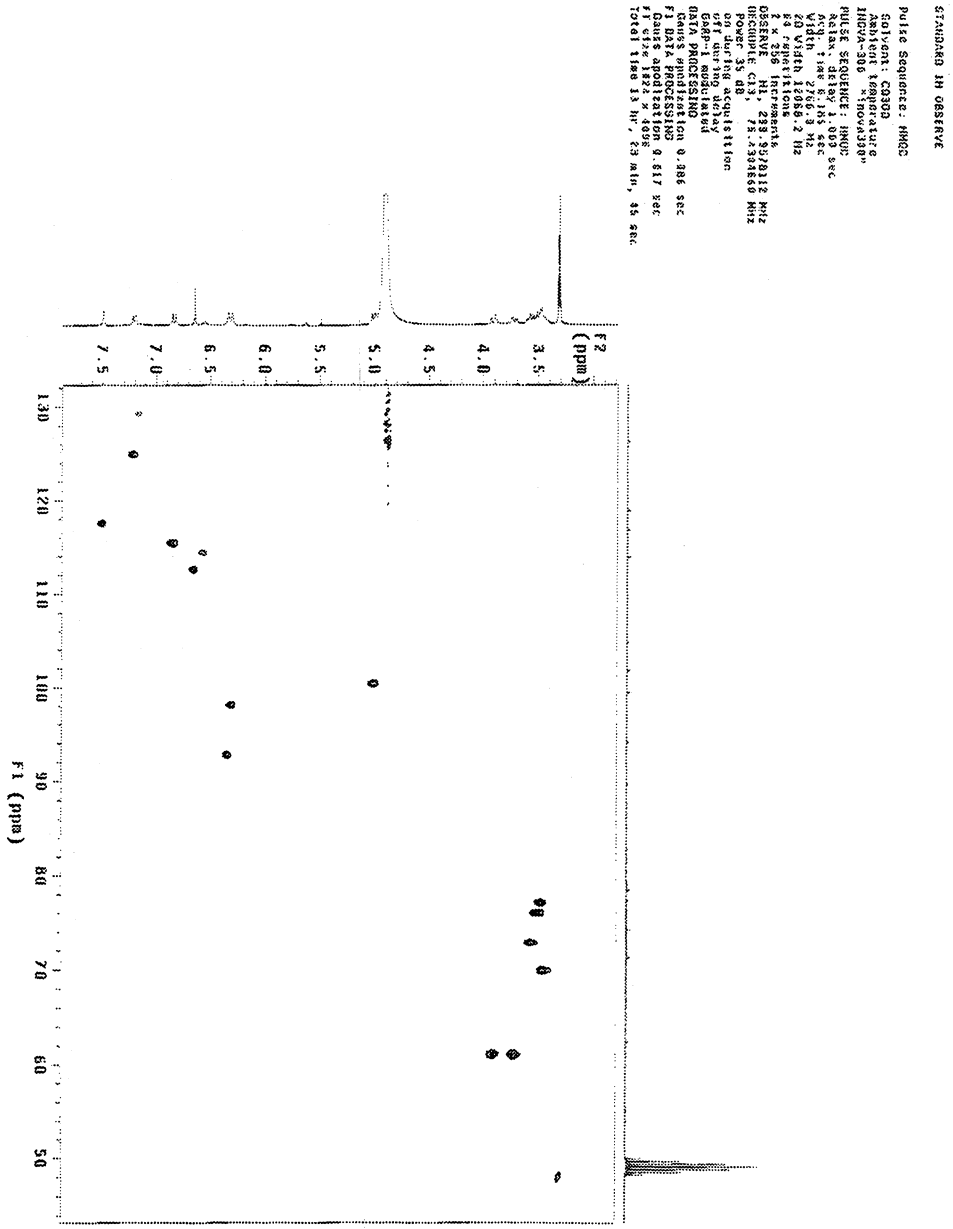
FIGURA 15 - ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DA SUBSTÂNCIA AC3

FIGURA 16 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO H-C TIPO HMQC

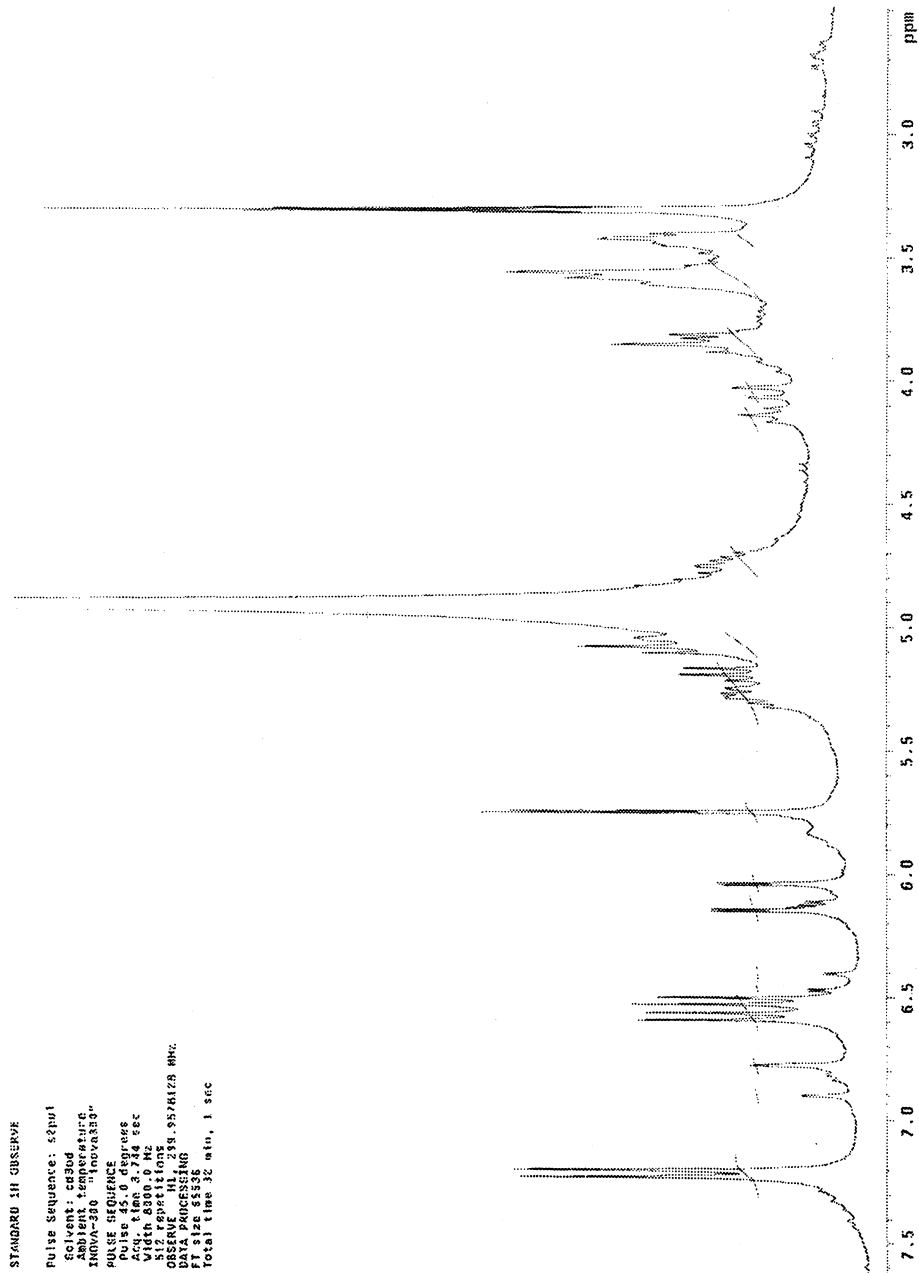


#### 4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA PRESENTE NA FRAÇÃO AC1

Na CLAE semi-preparativa realizada com a fração acetato de etila das flores de *Acacia longifolia*, foi isolada uma mistura de substâncias na fração AC1 com o tempo de retenção 3,75 min.

A CCD da fração apresentou uma mancha amarela principal no visível e mais duas manchas com leve fluorescência no UV 365 nm.

Após a análise do espectro de  $^1\text{H}$  RMN de (fig. 17), foi verificado que os compostos contaminantes apresentavam-se em elevada quantidade, impedindo a identificação da substância.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE  $^1\text{H}$  RMN DA FRAÇÃO AC1

## 4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS

### 4.2.1 PESQUISA DE ÓLEO VOLÁTIL

A extração das folhas por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger, após o período de 6 horas, apresentou apenas traços de óleo.

### 4.2.2 PESQUISA DOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS

#### 4.2.2.1 EXTRATO AQUOSO A 20%

Os resultados obtidos para o estudo das substâncias presentes no extrato aquoso seguem na tabela abaixo:

**TABELA 8 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO**

Grupo Fitoquímico Pesquisado	Resultado
Heterosídeos Antociânicos	negativo
Saponinas	positivo
Taninos	
cloreto férrico 1%	positivo
gelatina 2,5%	positivo
cloridrato de emetina 1%	positivo
sulfato de ferro amoniacal	positivo
acetato de chumbo	positivo

#### 4.2.2.2 EXTRATO ALCOÓLICO A 20%

Os resultados obtidos para o estudo das substâncias presentes no extrato alcoólico seguem na tabela abaixo:

**TABELA 9 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ALCOÓLICO**

Grupo Fitoquímico Pesquisado	Resultado
<b>Alcalóides</b>	
Fração hidroalcoólica remanescente	positivo para Bouchardat
demais frações	negativo
<b>Leucoantocianidinas</b>	
fração AcOEt	positivo
demais frações	negativo
<b>Heterosídeos Flavônicos</b>	
Fração hidroalcoólica remanescente	positivo
demais frações	negativo
<b>Teste oxálico: bórico (flavonóides)</b>	
todas das frações	negativo
<b>Cumarinas</b>	
todas das frações	negativo
<b>Esteróides e/ ou triterpenos</b>	
fração hexano	positivo
todas das frações	negativo
<b>Antraquinonas</b>	
todas das frações	negativo

## 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 4.3.1 TESTE DO CRESCIMENTO

Após o período de 7 dias de germinação, as caixas Gerbox foram retiradas do germinador e procedeu-se a medida do tamanho da radícula e do hipocótilo da plântula. Foi realizado um cálculo percentual das medidas dos extratos comparando às do controle.

A fração hexano na concentração de 0,005 g/ml estimulou o crescimento em 3% da radícula e inibiu em 34% o crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,01 g/ml estimulou em 3,8% o crescimento da radícula e inibiu em 42% o crescimento do hipocótilo. Nas concentrações de 0,02 e 0,05 g/ml, os efeitos se igualaram, ocorreu uma inibição de 25% no tamanho da radícula e de 42% no tamanho da radícula, (*fig. 18*).

Na fração clorofórmio a menor concentração 0,005 g/ml inibiu 52% do crescimento da radícula e 15% do crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,01 g/ml a inibição da radícula permaneceu em 52% e a do hipocótilo aumentou para 60%. Na concentração de 0,04 g/ml a inibição do hipocótilo permaneceu em 60% e a da radícula subiu para 81%. Na concentração de 0,07 g/ml não ocorreu germinação, (*fig. 18*).

A naringenina, um flavonóide presente em elevada concentração na fração clorofórmio, apresentou na concentração de 0,005 g/ml uma inibição no crescimento da radícula de 11% e de 26% para o hipocótilo, (*fig. 18*).

A concentração 0,01 g/ml do extrato AcOEt estimulou 1,6% do crescimento da radícula e inibiu 50% do crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,02 g/ml ocorreu inibição de 22% no crescimento da radícula e de 63% no crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,04 g/ml a inibição do hipocótilo permaneceu em 63% e a inibição da radícula aumentou para 40%. Na concentração de 0,08 g/ml a inibição do crescimento da radícula foi de 62% e do hipocótilo 71%, (*fig. 19*).

O extrato das folhas na concentração de 0,005 g/ml não alterou o crescimento da radícula, porém inibiu 23% do crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,01 g/ml houve inibição de 3,1% no crescimento da radícula e de 26% no crescimento do hipocótilo. Na concentração 0,02 g/ml ocorreu inibição de 20% no crescimento da radícula e de 33% no crescimento do hipocótilo. Na concentração de 0,05 g/ml a inibição da radícula permaneceu em 20% e a do hipocótilo aumentou para 50%, (*fig. 19*).

Portanto, todos os extratos demonstraram influenciar o crescimento da plântula. A fração hexano e o extratos das folhas apresentaram um efeito menos pronunciado quando comparado com as frações AcOEt e clorofórmio. Destas, a fração clorofórmio mostrou-se mais eficaz sobre a inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo.

FIGURA 18 - PERCENTUAL DE CRESCIMENTO FRAÇÃO HEXANO E CLOROFÓRMIO

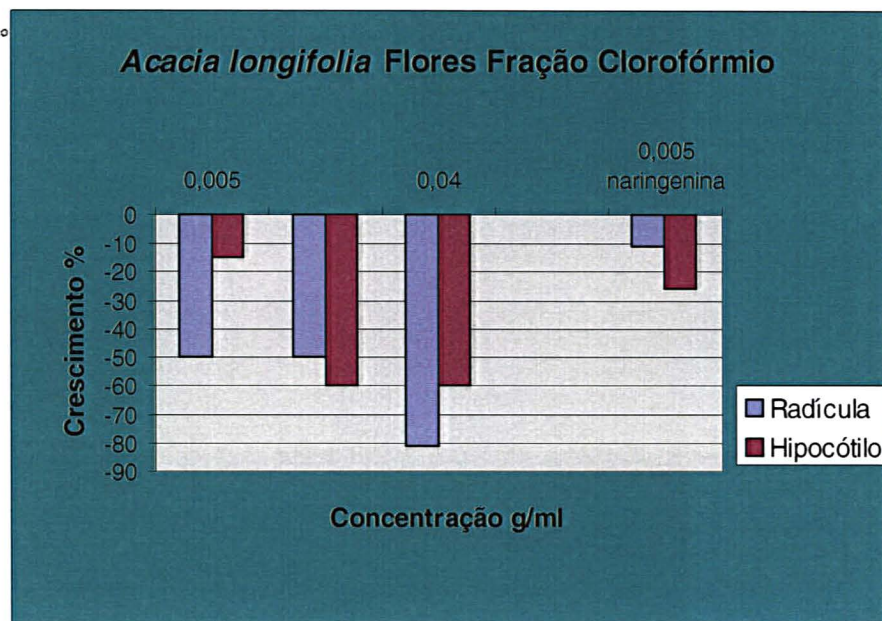
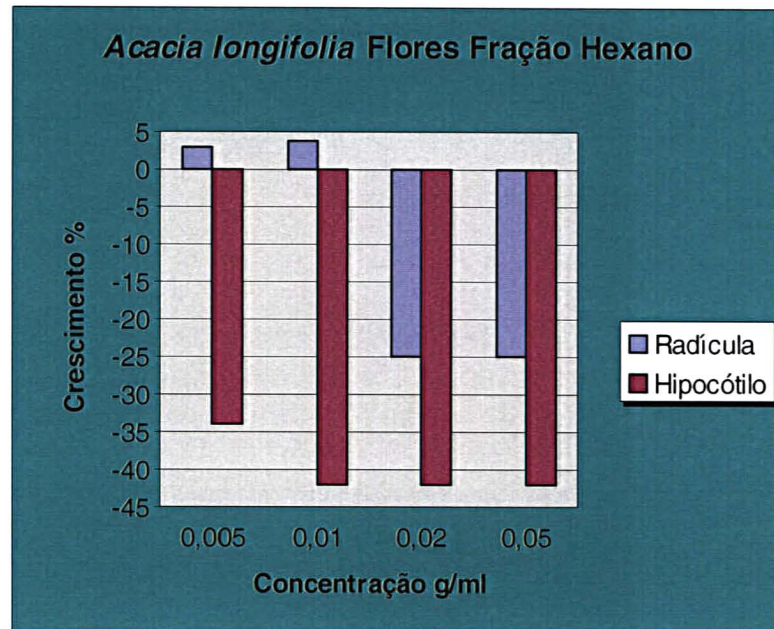
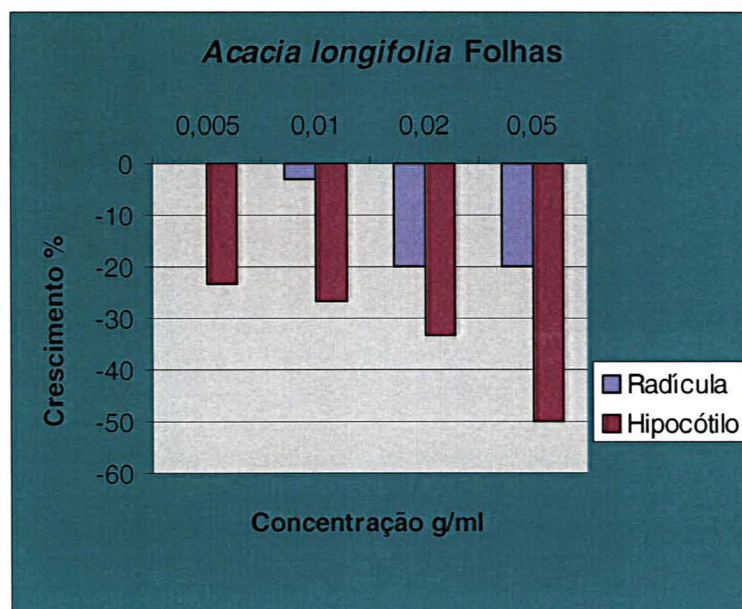
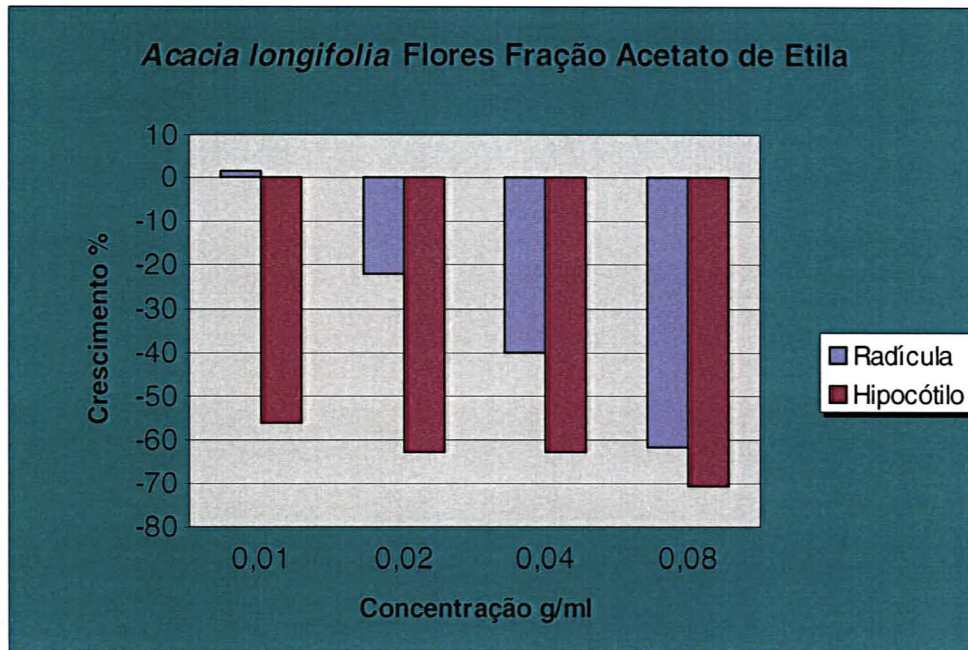


FIGURA 19 - PERCENTUAL DE CRESCIMENTO FRAÇÃO AcOEt E EXTRATO FOLHAS



#### 4.3.2 TESTE DA GERMINAÇÃO

Durante o período de 5 dias, foi verificado o número de sementes que germinavam diariamente. Foi observado no final deste período se os extratos apresentaram efeito sobre a germinação. As sementes utilizadas como controle germinaram 100% em 24 horas.

A fração hexano e o extrato das folhas não demonstraram efeito sobre a germinação das sementes.

A fração AcOEt, no período de 5 dias, na concentração de 0,08 g/ml apresentou um atraso na germinação. No primeiro dia germinaram 51% das sementes, enquanto nas concentrações menores, no mesmo período a germinação foi de 90%, (*fig. 22*). Decorridos 5 dias, na concentração de 0,08 g/ml, 92% das sementes germinaram.

Na fração clorofórmio todas as concentrações demonstraram variação do número de sementes germinadas, (*fig. 20*). No primeiro dia as sementes com concentrações menores 0,005 e 0,01 g/ml germinaram respectivamente 70 e 56%, no final do período quase a totalidade das sementes germinaram. Nas concentrações maiores ocorreu uma forte inibição da germinação. Na concentração de 0,04 g/ml, 36% das sementes germinaram no último dia, e na concentração de 0,08 g/ml apenas 17% das sementes germinaram.

A naringenina, substância presente na fração clorofórmio, na concentração de 0,005 g/ml, não apresentou variação na germinação das sementes durante os 5 dias, (*fig. 21*), enquanto a fração clorofórmio na mesma concentração inibiu a germinação no primeiro dia em 51%, indicando que a naringenina não é a responsável pela inibição da germinação na fração clorofórmio.

FIGURA 20 - PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO FRAÇÃO HEXANO E CLOROFÓRMIO

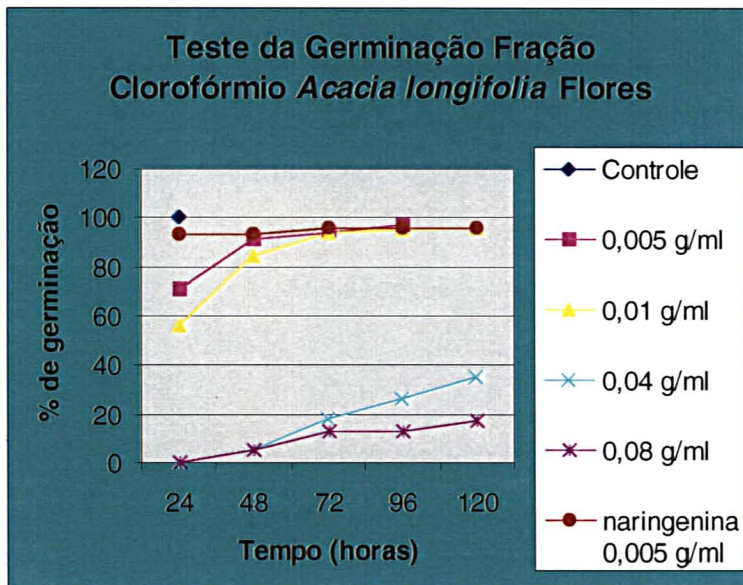
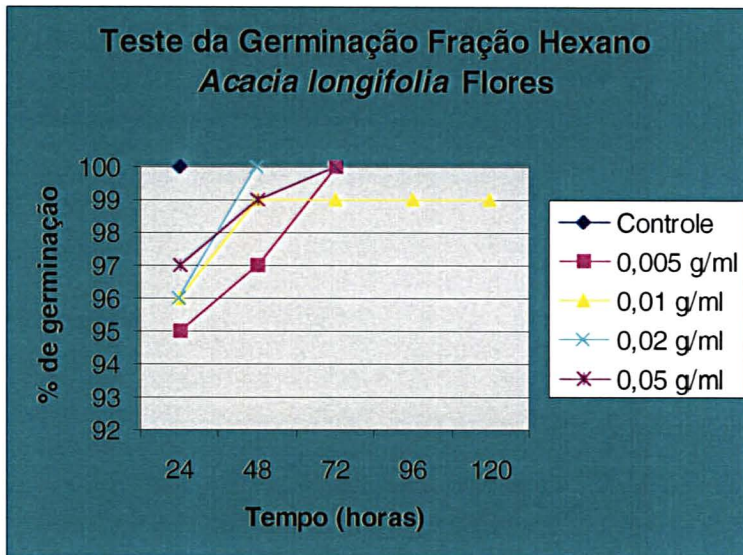
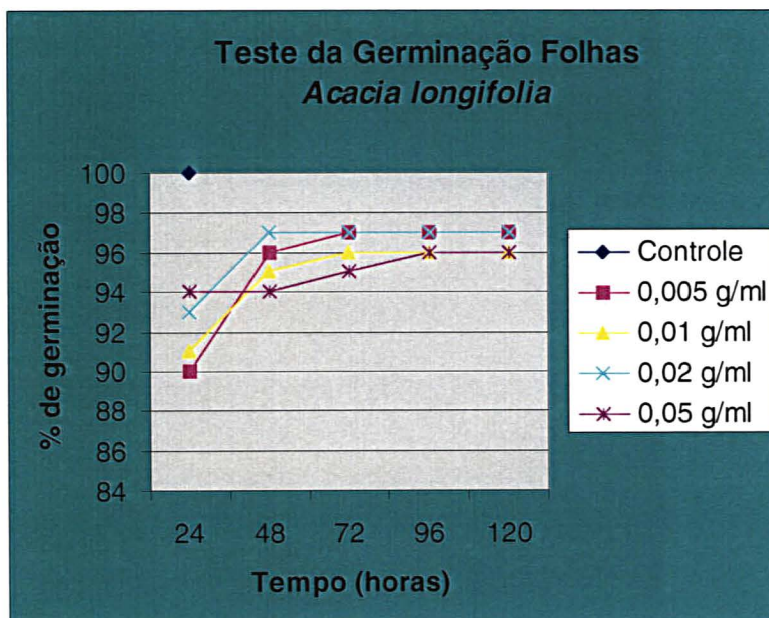
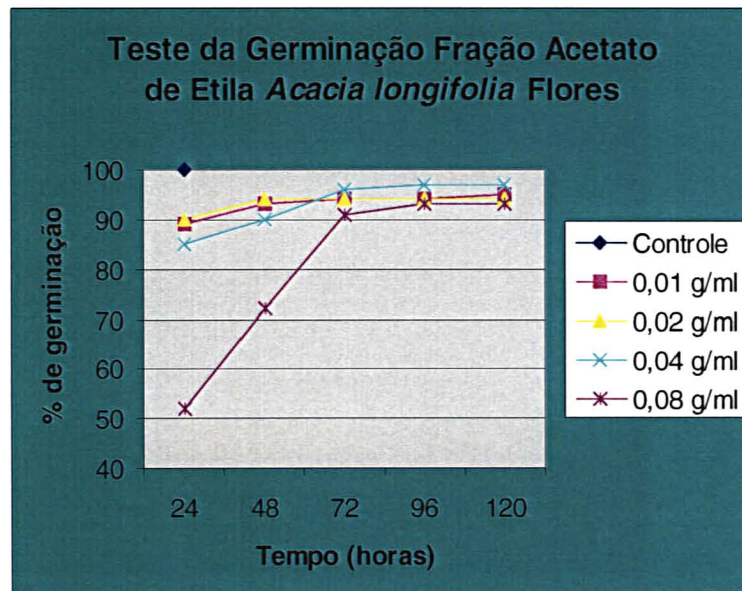


FIGURA 21 - PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO FRAÇÃO AcOEt E EXTRATO FOLHAS



#### 4.3.3 DISCUSSÃO GERAL DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Utilizando análise de variância, determinou-se que as menores concentrações da fração hexano, 0,005 e 0,01 g/ml apresentam o mesmo efeito sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo, e as maiores 0,02 e 0,05 g/ml demonstram efeitos diferentes, mas não significativos para inibir o crescimento da radícula e do hipocótilo.

Na fração clorofórmio a análise de variância demonstrou que todas as frações utilizadas apresentam efeitos diferentes sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo, indicando que o aumento da concentração inibe o crescimento de ambos, apresentando um elevado efeito alelopático na concentração de 0,04 g/ml, e inibindo totalmente o crescimento na concentração de 0,07 g/ml.

Na fração AcOEt a análise de variância demonstrou que todas as concentrações apresentam efeito diferente sobre o crescimento da radícula. O aumento da concentração inibe o crescimento da radícula. Em relação ao crescimento do hipocótilo as concentrações 0,01, 0,02, e 0,04 g/ml apresentam o mesmo efeito, inibindo o crescimento. Na concentração de 0,08 g/ml foi verificado um efeito sobre a inibição do crescimento mais elevado que as demais.

O extrato das folhas demonstrou nas menores concentrações 0,005 e 0,01 g/ml o mesmo efeito sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo. As concentrações 0,02 e 0,05 g/ml apresentam o mesmo efeito, não significativo, sobre o crescimento da radícula, porém demonstram um leve efeito inibindo o crescimento do hipocótilo.

Realizando uma regressão foi verificado que as frações AcOEt e clorofórmio apresentam efeito significativo sobre o crescimento da radícula e hipocótilo. A fração clorofórmio apresenta um potencial de inibição do crescimento superior ao da fração AcOEt.

Comparando a fração clorofórmio na concentração de 0,005 g/ml e naringenina 0,005 g/ml, utilizando o teste 't' de Student, foi verificado que naringenina apresenta maior efeito sobre a inibição do hipocótilo que a fração clorofórmio. Porém a fração clorofórmio apresenta maior efeito sobre a inibição da radícula, indicando que o efeito

inibitório da fração clorofórmio sobre a radícula se deve principalmente a outros compostos presentes na fração e não exatamente devido à naringenina.

Utilizando análise de co-variância foi verificado que no teste de germinação o extrato das folhas, a fração hexano e AcOEt, não apresentam efeito significativo sobre a inibição da germinação das sementes. Entretanto a fração clorofórmio demonstrou um potencial de inibição elevado, e realizando uma regressão com as concentrações da fração clorofórmio, foi verificada uma inibição significativa das concentrações 0,04 e 0,08 g/ml.

Realizando uma análise geral pode-se perceber que as frações AcOEt e clorofórmio das flores demonstraram elevado potencial alelopático. A fração AcOEt apresentou forte inibição sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa*. A fração clorofórmio mostrou-se mais ativa que a AcOEt, atuando sobre a germinação e o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*.

O efeito alelopático demonstrado por estas frações pode ser devido aos constituintes fenólicos, como cumarinas e flavonóides presentes. Muitas espécies do gênero *Acacia* apresentam ação alelopática devido aos componentes fenólicos. Na *Acacia nilotica*, o extrato das cascas apresenta atividade alelopática, e os taninos são considerados os agentes alelopáticos. Os ácidos vanílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, gentísico, *p*-cumárico, cafeico e ferúlico, são os responsáveis pelo efeito alelopático de várias espécies de *Acacias*.

A inibição do crescimento da radícula pode implicar na diminuição de nutrientes pela raiz, prejudicando o desenvolvimento e sobrevivência da planta. A inibição do hipocótilo pode ocasionar a formação de folíolos deficientes, dificultando a possibilidade de realizar fotossíntese, diminuindo também a sobrevivência da planta.

Sendo assim a fração clorofórmio das flores de *Acacia longifolia* apresenta elevada inibição na germinação de sementes e no crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*, indicando possível aplicação como herbicida natural.

A busca de novos herbicidas naturais é muito importante, pois o uso indiscriminado de herbicidas tem resultado no aumento da resistência de plantas

daninhas a algumas classes destes, tais como triazinas, dinitroanilinas, imidazolinonas entre outros, bem como acarretando prejuízo ambiental e à saúde humana.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Após o período de 24 horas de incubação as placas contendo as bactérias pesquisadas foram retiradas da estufa. Verificou-se um clareamento ao redor dos discos impregnados 1000 e 2000  $\mu\text{g}$  (fig. 22), com o extrato bruto etanólico das folhas, para os tratamentos com *S. aureus* e nos discos de 2000  $\mu\text{g}$  (fig. 24). para os tratamentos com *P. aeruginosa*. Evidenciando desta forma uma atividade antibacteriana, devido a presença de pequenos halos de inibição.

Para as amostras testadas com *E. coli* nenhum halo de inibição foi formado, (fig. 23), indicando que o extrato bruto etanólico das folhas de *A. longifolia* nas concentrações testadas não apresenta atividade antimicrobiana sobre esta bactéria.

Verificada a presença de halo de inibição nas placas contendo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi realizado novo ensaio com os discos com as frações precipitado, hexano, clorofórmio, AcOEt e extrato etanólico remanescente, na concentração de 1000  $\mu\text{g}$  por disco, incubando as placas na estufa a 35 °C por 24 horas. Após este período, foi verificada a presença de halos de inibição para as amostras da fração AcOEt e extrato etanólico remanescente, para o tratamento com *S. aureus* (fig. 25). O tratamento com *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou atividade.

Na tabela 10, o halo de inibição formado em cada bactéria por 30  $\mu\text{g}$  de cloranfenicol.

TABELA 10 - HALO DE INIBIÇÃO DO CLORANFENICOL 30  $\mu\text{g}$  SOBRE AS CEPAS

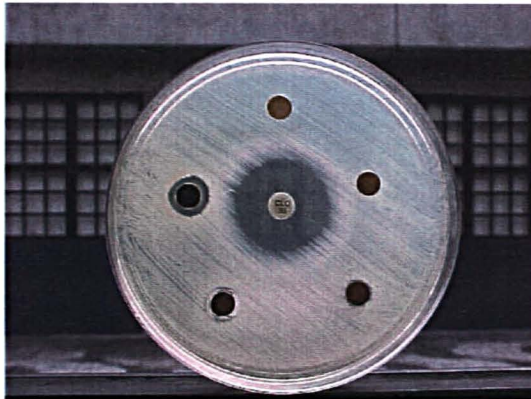
Microorganismo	Halo de inibição do cloranfenicol 30 $\mu\text{g}$ em mm
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	26
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11129)	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	13

TABELA 11- RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

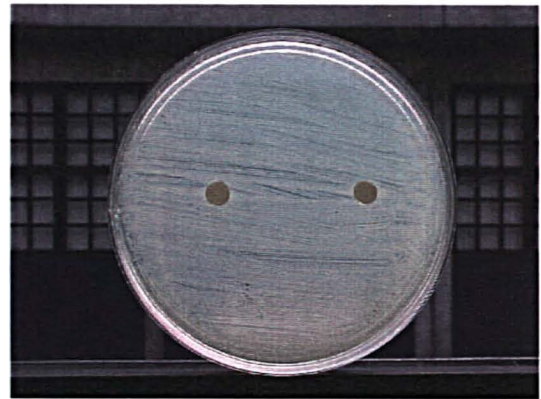
Quantidade em µg em cada disco	Halo inibição em mm de <i>S. aureus</i>	Halo inibição em mm de <i>E. coli</i>	Halo inibição em mm de <i>P. aeruginosa</i>
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	9,5	0	0
2000	11,3	0	7,5

TABELA 12 - RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO FRACIONADO

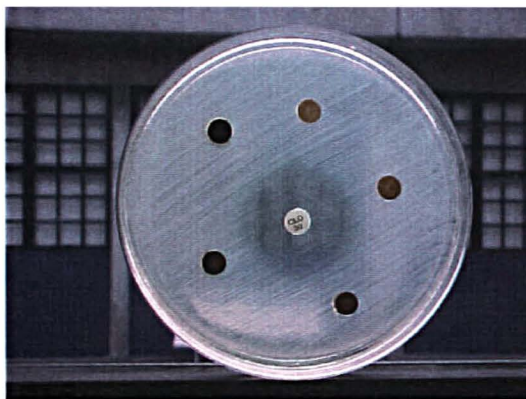
Frações 1000 µg por disco	Halo inibição em mm de <i>S. aureus</i>	Halo inibição em mm de <i>P. aeruginosa</i>
Precipitado	0	0
Hexano	0	0
Clorofórmio	0	0
Acetato de etila	13,5	0
Extrato etanólico remanescente	9,3	0

FIGURA 22 - PLACAS COM *S. aureus*

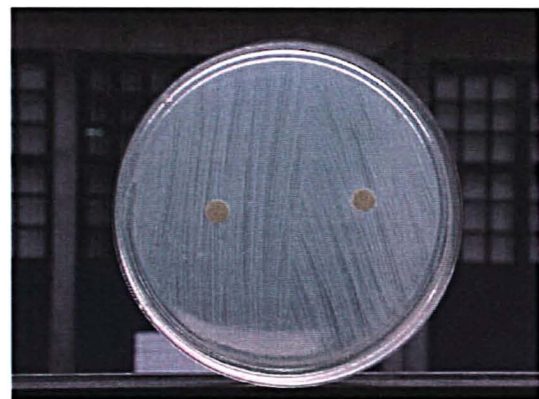
Placa com extrato bruto etanólico



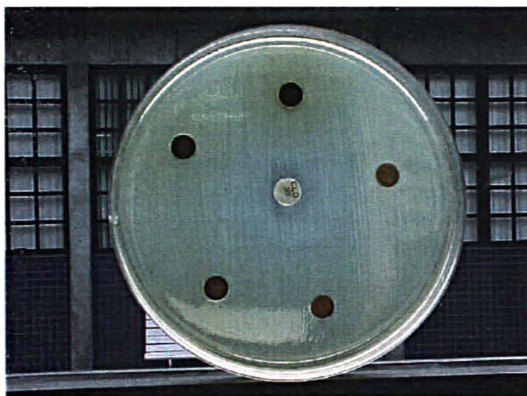
Placa com controle dos solventes

FIGURA 23 - PLACAS COM *E. coli*

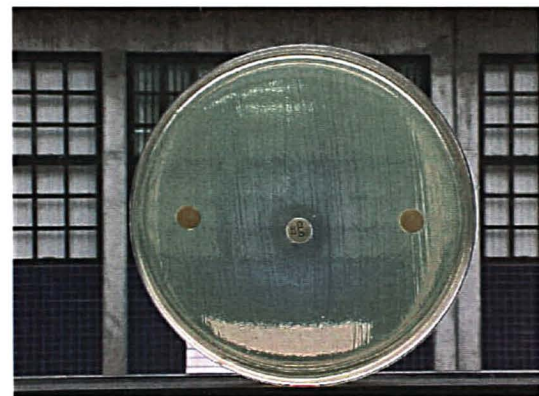
Placa com extrato bruto etanólico



Placa com controle dos solventes

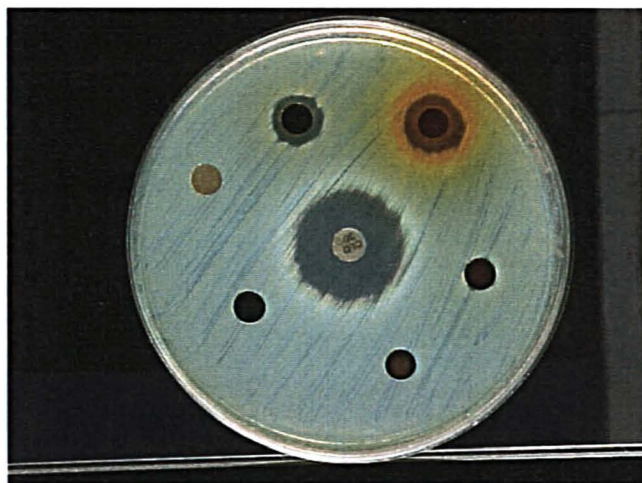
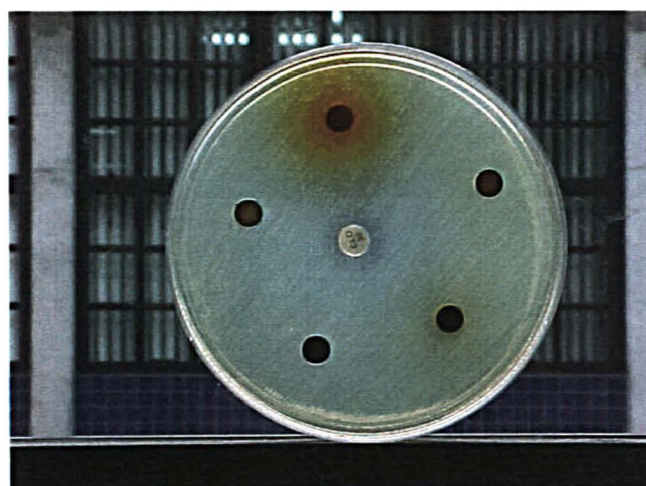
FIGURA 24 - PLACAS COM *P. aeruginosa*

Placa com extrato bruto etanólico



Cloranfenicol e controle dos solventes

FIGURA 25- PLACAS COM O EXTRATO FRACIONADO

*S. aureus**P. aeruginosa*

O halo de inibição provocado pelo extrato bruto etanólico para *S. aureus* foi de 9,3 mm e 11,3 mm para 1000 e 2000 µg respectivamente (*tab. 11*). Para *P. aeruginosa* na concentração de 2000 µg, o halo de inibição foi de 7,5 mm, (*tab. 11*), bem menor que para *S. aureus*, indicando um maior efeito do extrato bruto etanólico sobre esta última.

Nos extratos fracionados foi verificado que a fração AcOEt apresentou halo de inibição de 13,5 mm e o extrato hidroalcoólico remanescente apresentou halo de 9,5 mm (*tab. 12*). Isto indica que o efeito antimicrobiano do extrato se deve principalmente à fração AcOEt. De acordo com o estudo fitoquímico realizado neste trabalho, a fração AcOEt possui elevado teor de polifenóis. Sendo assim é possível que a ação antimicrobiana desta fração seja devido a estes grupamentos químicos. O processo de partição realizado em funil de separação, não garante uma separação uniforme dos componentes, por isso a fração AcOEt e o extrato hidroalcoólico remanescente, apresentaram atividade antimicrobiana. O composto ou o grupo de compostos responsáveis pelo efeito, estão presentes tanto na fração AcOEt quanto no extrato hidroalcoólico remanescente, e em maior concentração na fração AcOEt.

Muitas espécies do gênero *Acacia* apresentam atividade antibacteriana. Os extratos aquoso e etanólico dos frutos de *A. nilotica* apresentam atividade contra cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos, e o extrato hexânico possui atividade contra *Candida albicans* (MUSTAFA; TANIRA; NSANZE, 1999). O extrato das folhas demonstra efeito antimicrobiano sobre *Clostridium perfringens*, sua ação está correlacionada ao teor de taninos (polifenóis) (SOTOHY; ISMAIL; MUELLER, 1995).

Não foi verificado efeito dos extratos fracionados sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, indicando que as frações nas concentrações testadas não apresentam atividade antibacteriana sobre este patógeno.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Poucas espécies do gênero *Acacia* possuem atividade antifúngica. A *Acacia nilotica* apresenta efeito antimicrobiano sobre a levedura *Candida albicans*, e a sua ação também como o *Clostridium perfringens*, está relacionado ao teor de polifenóis.

A fração AcOEt das flores, com elevado teor de flavonóides, na concentração de 1000 ppm, apresentou um efeito significativo no crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*, inibindo 50% do crescimento micelial.

Para o *Cylindrocladium spathulatum*, patógeno da erva-mate o efeito do extrato AcOEt das flores foi bem menos significativo, inibindo 16% do crescimento micelial (tab. 13).

O extrato bruto etanólico das folhas na concentração de 1000 ppm apresentou um potencial de inibição pouco significativo sobre os fungos *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium spathulatum*.

Os extratos testados não apresentaram ação antifúngica sobre o *Colletotrichum acutatum*, patógeno do morango. Ambos os extratos estimularam o crescimento micelial do fungo. O extrato AcOEt estimulou 34,55% do crescimento em relação ao controle, e o extrato bruto etanólico estimulou 98,9%. Nestes casos os extratos podem ter sido utilizados como fonte de carbono ou terem atuados como um fator hormonal de crescimento.

TABELA 13 - RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Extratos 1000 ppm	<i>Colletotrichum acutatum</i> % de inibição	<i>Fusarium oxysporum</i> % de inibição	<i>Cylindrocladium spathulatum</i> % de inibição
AcOEt	- 34,55	50	16
Bruto das Folhas	-98,9	9,5	3,3

## 5 CONCLUSÃO

Em relação aos objetivos propostos por este trabalho, visando contribuir ao estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd., algumas considerações podem ser feitas.

A fração AcOEt das flores, submetida a CLAE semi-preparativa, levou ao isolamento e a uma proposta de identificação de uma aurona, como sendo 4-O-galactosil aureusidina. A presença da mesma em flores de *Acacia longifolia* nunca havia sido mencionada.

O estudo fitoquímico das folhas revelou a presença de alcalóides, saponinas, taninos, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos e esteróides.

A avaliação da atividade alelopática dos extratos demonstrou que assim como outras espécies de Acacias, a *Acacia longifolia* apresenta efeito alelopático. A fração clorofórmio das flores apresentou elevado potencial alelopático, inibindo a germinação das sementes e o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*. O levantamento deste dado é muito importante, pois a agricultura moderna, utiliza agrotóxicos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Logo o estudo do potencial alelopático pode vir a contribuir na busca de novos herbicidas, que não causem tamanho prejuízo.

O extrato bruto etanólico das folhas nas concentrações de 1000 e 2000 µg apresentaram atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, e na concentração de 2000 µg sobre *P. aeruginosa*. Os extratos AcOEt e etanólico remanescente na concentração de 1000 µg inibiram o crescimento de *S. aureus*, porém não alteraram o crescimento de *P. aeruginosa*. Para as amostras testadas com *E. coli* não ocorreu formação de halo de inibição, indicando que o extrato bruto etanólico das folhas nas concentrações testadas não apresenta efeito antimicrobiano sobre este patógeno.

No ensaio da atividade antifúngica na concentração de 1000 ppm o maior efeito foi demonstrado pela fração AcOEt das flores sobre o fungo *Fusarium oxysporum*, inibindo 50% do crescimento micelial. Para o *Cylindrocladium spathulatum* não houve inibição significativa dos extratos, 16% de inibição da fração AcOEt e 3,3% para o extrato bruto etanólico das folhas. Para o *Colletotrichum acutatum*, ocorreu um

processo de estímulo do crescimento, 34% de estímulo, para a fração AcOEt e 98,9% para o extrato bruto das folhas.

Analisando todos os objetivos inicialmente propostos, verificou-se que *Acacia longifolia* apresenta potencial alelopático sobre sementes de *Lactuca sativa* e antibacteriana sobre *S. aureus*. Mais estudos devem ser realizados afim de se conhecer os componentes responsáveis pelos efeitos demonstrados.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, K. P.; RASTOGI, R. P.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Flavonoids. *Heterocycles*, vol 16, n. 12, p. 2181-2236, 1981.
- AMOS, S. *et al.*. The pharmacological effects of an aqueous extract from *Acacia nilotica* seeds. *Phytotherapy Research*. v. 13, n. 8, p. 683-685, 1999.
- ANDREW, P.; WARD, R. S.; HELLER, H. G.. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of (Z) and (E)-Aurones. *Journal Chem. Soc. Perkin I*, p. 328-329, 1979.
- 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.
- ASEN, S.; PLIMMER, R. 4,6,4'-trihidroxyaurone and other flavonoids from *Limonium*. *Phytochemistry*. v. 11, p. 2601-2603, 1972.
- AUER, C.G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. *IPEF*, v. 32, p. 49-51, 1986.
- AYOUB, S.M.H. Flavonol molluscicides from the Sudan acacias. *International Journal of Crude Drug Research*, v. 23, n. 5, p. 87-90, 1985.
- AZUINE, M.A.; BHIDE, S.V. Adjuvant chemoprevention of experimental cancer: catechin and dietary turmeric in forestomach and oral cancer models. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 44, n. 3, p. 211-217, 1994.
- BABU, S. P. S. *et al.*. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. *Japanese Journal of Pharmacology*. v. 75, n. 4, p. 451-454, dezembro, 1997.
- BARAKAT, H. H. *et al.*. Flavonoid galloyl glucosides from the pods of *Acacia farnesiana*. *Biochemistry and Molecular Biophysics*. v. 51, n. 1, p. 139-142, maio, 1999.
- BATISH, D.R. *et al.*. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. *Environmental and Experimental Botany*. V. 47, p. 149-155, 2002.
- BHASKAK, V.; DASAPPA. Ground flora in Eucalyptus plantations of different ages. *Kerala Forest Research Institute*. P. 213-224, 1986.

BURKART, A. **Flora ilustrada catarinense. As Plantas Leguminosas Mimosoideas.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. p. 1-49.

CHOI, S. T. *et al.*. Allelopathic substances from *Allium fistulosum* inhibit the growth of Compositae crops. **Korean Society for Horticultural Science.** v. 39, n. 3, p. 333-337, 1998.

CHOU, C. H. Allelopathic researches in the subtropical vegetation in Taiwan. **Comparative Physiology and Ecology.** v. 5, n. 4, p. 222-234, 1980.

CLEMENT, B.A. Toxic Amines and Alkaloids from *Acacia belandieri*. **Phytochemistry.** v. 46, n. 2, p. 249-254, 1997.

CLEMENT, B.; GOFF, C. M.; FORBES, D. Toxic Amines and Alkaloids from *Acacia rigidula*. **Phytochemistry.** v. 49, n. 5, p. 1377-1380, 1998.

CHANDEL, B. S.; SHAH, 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.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v.1, p.17.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981, 1260 p.

DAFALLAH, A.; MUSTAFA, Z. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Chinese Medicine.** v. 24, n. 3-4, p. 263-289, 1996.

ELAKOVICH, S. D.; SPENCE, S.; YANG, J. Phytochemical inhibitions from the Nymphaeaceae: *Nymphaea odorata* and *Nuphar lutea*. **Biol. Act Nat. Prod: Agrochem.** p. 49-56, 1999.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien.** 12 ed. Berlin: Borntraeger, v. 2, 1964.

- EVANS, C.W. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed. London: Saunders, 1996. p. 41-214.
- FADL, EL M. A. Management of *Prosopis juliflora* for use in agroforestry systems in the Sudan. **Tropical Forestry Reports**. n. 16, p.107, 1997.
- FOURIE, T.G.; PREEZ, DU I.C.; ROUX, D.G. 3',4', 7,8-tetrahydroflavonids from the heartwood of *Acacia nigrescens* and their conversion products. **Phytochemistry**. v. 11, p. 1763-1770, 1972.
- GAW, Mc. L.J. *et al.*. Prostaglandin synthesis inhibitory activity in Zulu, Xhola and Sotho medicinal plants. **Phytoterapy Research**. v. 11, n. 2, 1997.
- GILANI, A.H. *et al.*. Studies on antihypertensive and antiespasmodic activities of methanol extract of *Acacia nilotica* pods. **Phytoterapy Research**. v. 13, n. 8, p.683-685, 1999.
- GONZÁLEZ, 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.
- GRIEVE, M. **A Modern Herbal the Medicinal, Culinary, Cosmetic, and Economic properties, Cultivation and Flokore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with all Their Modern Scientific Uses**. London: Tiger Books Internetal, 1998. p. 3-6.
- GUMNICKA, O.; OLERZEK, W. Triterpene saponins from the aerial parts of *Dianthus caryophyllus* varremont Hort. **Acta Soc. Bot. Pol.**. v. 67, n. 1, p. 65-68, 1998.
- HAGOS, M.; SAMUELSSON, G. Quantitative determination of quracol A, B and (+) – fisetinidol in bark and gum of *Acacia tortilis*. **Acta Pharm. Suec.** v. 25, n.6, p. 321-324, 1988.
- HASEGAWA, K. *et al.*. Isolation and identification of lepidemoide, a new allelopathic substance from mucilage of germinated cress seeds. **Plant Physiol.** v. 100, n. 2, p. 1059-1061, 1992.

- HU, F.; KONG, C. Allelopathy of *Ageratum conyzoides*. I Allelopathy of *Ageratum conyzoides* aqueous extract and isolation and identification of its allelochemicals. **Institute of Tropical and Subtropical Ecology**. v. 8, n. 3, p. 304-308, 1997.
- HUEI, T. L. *et al.*. Three new flavonol galloyl glycosides from leaves of *Acacia confusa*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 5, p. 710-712, 2000.
- INDERJIT, D. K. M. M. 7-O-glucoside (ononin), an additional growth inhibitor in soils associated with the weed, *Pluchea lanceolata* (DC) C. B. Clarke (Asteraceae). **Journal Chemical Ecology**. v. 18, n. 5, p. 713-718, 1992.
- 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.
- 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.
- JIMENEZ, O. F. M. V. Z. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 24, n. 3, p. 195-205, 1996.
- JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Nacional, 1985. p. 370-377.
- LI, H. H. *et al.*. Allelopathy of *Sasa cernua*. **Journal Chemical Ecol.** v. 18, n. 10, p. 1785-1786, 1992.
- KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A. J. An ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. **Journal Ethnopharmacology**. v. 77, n. 1, p. 5-9, setembro, 2001.
- KATO, N.H. *et al.*. Allelopathy of oats. Assessment of allelopathic of extract of oat shoots and identification of an allelochemical. **Journal of Chemical Ecology**. v. 20, n. 2, p. 309-314, 1994.
- KATO, N.H.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S. Allelopathic potential of 5-chloro-6-methoxy-2-benzoxazolinone. **Phytochemistry**. v.48, n. 3, p. 433-435, 1998.
- KERBER, V.A.; SILVA, G. A. A. G. Cumarinas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 64-66, 1990.
- KERBER, V.A.; SILVA, G.A.A.B. Flavonoids of *Acacia longifolia* (Andr) Willd-Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 74, n. 1, 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.

KHALID, S.A. *et al.* (+)-catechin-5-galloyl ester as a novel natural polyphenol from the bark of *Acacia nilotica* of sudanese origin. **Planta Medica**, v. 55, n. 6, p.556-558, 1989.

KHAN, M. N.; 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. Changes in the allelopathic potential in relation to incubation conditions of soil mixed with *Acacia pubescens* (Venten.) leaf power. **Journal of Weed Science and Tecnology**. n. 16, p. 107, 1999.

KOITABASCHI, R. 1,8-cineole inhibits root growt and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica compestris* L. **Journal Plant Res.**. v. 110, n 1-6, 1097, 1997.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACIAS, F.A. *et al.* Potential Allelopathic Guaianolides from Cultivar Sunflowers leaves, var. SH 222. **Phytochemistry**. v. 34, n. 3, p. 669-674, 1993.

MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; ESTEBAN, M. D. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive frations of *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**. v. 36, n. 6, p. 1369-1379, 1994.

MACIAS, F. A. *et al.* Natural products as allelochemicals 10. Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. **Phytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 165-171, 2000.

MALAN, E.; SWARTZ, P. A comparative study of the phenolic products in the heartwood of *Acacia karroo* from two different locatities. **Phytochemistry**. v. 39, n. 4, p. 791-794, 1995.

MARINI-BETTOLO, G.B.; FALCO, M.R. Ricerche sui pigmenti delle mimosaceae del sud America, Naringenine de una *Acacia Longifolia* del Rio de la Plata. **Ann. Chim.**, n. 41, p.221-226, 1951.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robel Editorial, 1999, p. 11 – 23.

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.

MUSTAFA, N. K.; TANIRA, M. O.M.; NSANZE, H. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* subsp. *Nilotica* fruit extracts. **Pharmacy and Pharmacology Communications**. v. 5, n. 9, p. 583-586, setembro, 1999.

MUSTAFA, AL Z.H.; DAFALLAH A. A. A study on the toxicology of *Acacia nilotica*. **American Journal of Chinese Medicine**. v. 28, n. 1, p. 123-129, 2000.

NABI, ABD *et al.*. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *nilotica* (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 37, n. 1, p. 77-79, 1992.

NASSAR, M. I. Apigenin C-glycosides from the leaves of *Acacia laeta* and their anticancer activity evaluation. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 40, n. 1, p. 73-77, 1999.

NAZIF, N. M.; SOLIMAN, A. M.; RADWAN, H. M. Bioassay guided isolation of molluscicides from certain medicinal plantas. **Hamdard Medicus**. v. 44, n. 2, p. 33-37, 2001.

NSOLOMO, V.R.; MRECHA, M. S.; MAGHEMBE, J. A. Effect of *Acacia xanthophloea* leachates on seed germination of some agricultural and multipurpose tree crops. **Journal of Tropical Forestry Science**. v. 7, n. 3, p. 398-404, 1995.

OHNO, S. *et al.*. A species selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. **Phytochemistry**. v. 56, p. 577-581, 2001.

PAGE, J.E.; MADRINAN, S.; TOWERS, G. H. N. Identification of plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the "Devil's Garden". **Experientia**. v. 50, n. 9, p. 840-842, 1994.

POLYA, M. G.; FOO, L. Y. Inhibition of eucaryote signal regulated protein kinase by plant derived catechin related compounds. **Phytochemistry**. v. 35, n. 6, p.1399-1405, 1994.

POPOCCA, J. *et al.*. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican tradicional medicine. **J. of Ethnopharmacology**, v.59, n.3, p.173-177, 1998.

- QUER, F. **Plantas Mediciniais**. 11. ed. Barcelona: Labor, 1988, p. 349.
- RAMAMOORTHY, M.; PALIWAL, K. Allelopathic compounds in leaves of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. and its effect on *Sorghum vulgare* L. **Journal Chem.**
- REIGOSA, M. J.; CASAL, J.R.; CARBALLEIRA, A. Allelopathic effect of *Acacia dealbata* Link during flowering. **Stvalia Oecologica**. v. 3, n. 1/3, p. 135-150, 1984.
- ROBBERTS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, E. V. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- ROVELLI, B.; VAUGHAN, G. N. Alcaloids of *Acacia* I. N, N-dimethyl-triptamine. **Aust. J. Chem.**, v. 20, n. 6, p. 1299-1300, 1967.
- SHAH, B.H. *et al.*. The antiplatelet agregatory activy of *Acacia nilotica* is due to blocfade of calcium influx through membrane calcium. **Gen. Pharmacol.**, v. 29, n. 2, p.251-255, 1997.
- SAHAI, R.; AGARWAL, S.K.; RASTOGI, R.P. Auriculoside a new flavan glycoside from *Acacia auriculiformis*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1560-1562, 1980.
- SCHULZ, M. *et al.*. Allelopathic effects of living quack grass (*Agropyron repens* L.), identification of inhibitory allelochemicals exuded from rhizome borne roots. **Angew Bot.** v. 68, n 5/6, p. 195-200, 1994.
- SEABRA, R.M. *et al.*. Methoxylated Aurones from *Cyperus capitatus*. **Phytochemistry**, vol. 45, n. 4, p. 839-840, 1997.
- SEKINE, *et al.*. 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.
- SHAM, J.S.K.; CHIU, K. W.; PANG, P.K.T. Hipotensive action of *Acacia catechu*. **Planta Médica**. V. 50, n. 2, p. 177-180, 1984
- SILVA, V. C. da. **Análise dos Flavonóides de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. Leguminosae-Mimosoideae**. Curitiba, 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná
- SIMÕES, M. O. *et al.*. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade, 2000, p. 342.
- SISSI, EL H.I.; SHERBEING, A.E.A. The flavonoid components of the leaves of *Acacia saligna*. **Qualit. Plant Mater Veg**. v. 14, n. 3, p. 257-266, 1967.

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.

SOULÉ, M.E. Conservation tactics for a constant crisis. **Science**, n. 253, p. 744-750, 1991.

STANGARLIN, J. R. *et al.*. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biociencia: Ciência e Desenvolvimento**. v. 10, n. 1, p. 126-131, jan./mar., 1999.

STASI, L. C. D. *et al.*. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

SUZUKI, M. *et al.*. An allelopathic polyunsaturated fatty acid from red algae. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 63-65, 1996.

SWAMINA, T.C.; RAI, 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.

TAKAHASHI, Y. *et al.*. Isolation and identification of phenolic compounds in the shoot of *Lolium perenne* L. **Chugoku Natl. Agric. Exp. Stn.** v. 38, n. 2, p. 226-233, 1992.

TAKAHASHI, Y.; OTANIS, I.; HAGINO, K. Studies on allelopathic interactions among some grassland species. **Nippon Sochi Gakkaish.** v. 39, n. 2, p. 236-245, 1993.

THIEME, H.; KHOGALI, A. Über das Vorkommen von Flavonoiden und Gerbstoffen in den Blätter einiger afrikanischer *Acacia*-Arten. **Pharmazie**. v. 30, n. 11, p. 736-743, 1975.

TINDALE, D. M.; ROUX, D. G. A phytochemical survey of the Australian species of *Acacia*. **Phytochemistry**. v. 8, p. 1713-1727, 1969.

TZEN, C. S. *et al.*. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 7, p. 3420-3424, julho, 2001.

VOIRIN, B. *et al.*. Flavonoids from the flowers of *Acacia latifolia*. **J. of Nat. Prod.**, v.49, n.5, p.943, 1986.

WALLER, G. R.; JURZYSTA, M.; THORNE, R. L. Z. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat. **Bol. Bull. Acad. Sin.** v. 34, m. 1, p. 1-11, 1993.

YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA. Lepidimoide allelopathic substance in exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**. v. 9, n. 5, p. 1031-1032, 1995.

YAMAMOTO, T. *et al.*. Allelopathic substance exuded from a serious weed, germinating barnyard grass (*Echinochloa crus-galei*). **Journal Plant Growth Regul.** v. 18, n. 2, p. 65-67, 1999.

YAMANE, A. *et al.*. Isothiocyanates as allelopathic compounds from *Rorippa indica* Hiern (Cruciferae) roots. **Journal Chem. Ecol.** v. 18, n. 11, p. 1941-1954, 1992.

YAZAKI, Y. *Acacia storyi*: a potential tannin producing species. **Australian-Forestry**. v. 60, n. 1, p. 24-28, 1997.

YUNES, A. R.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sobre a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001, 500 p.

ZHEN, R. *et al.*. Isolation and identification of allelopathic compounds in the volatile oil. **The Chinese Academy of Sciences**. v. 22, n. 3, p. 311-314, 1996.

ZHU, H; MALLIK, A.U. Interactions between *Kalmia* and black spruce: isolation and identification of allelopathic compounds. **Journal Chem. Ecol.** v. 20, n. 2, p. 407-421, 1994.