

VIRGINIA CLAUDIA DA SILVA

**ANÁLISE DOS FLAVONÓIDES DE *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.  
LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à 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. Vitor Alberto Kerber

Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

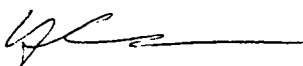
CURITIBA  
2001

**“Análise dos flavonóides de *Acacia longifolia* (Andr.)  
Willd. Leguminosae-Mimosoideae”**

por

**VIRGINIA CLÁUDIA DA SILVA**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
Para obtenção do grau de Mestre no Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão  
Examinadora



*Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber (Orientador/Presidente)*



*Dr. Albino Grigoletti Júnior (EMBRAPA)*



*Profa. Dra. Marília Dallarmi Miguel (UFPR)*

*Curitiba, 20 de Dezembro de 2001*

**AOS MEUS PAIS**  
Pelo carinho, incentivo e dedicação que  
me permitiram chegar até aqui.

**Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber, meus  
sinceros agradecimentos pela constante  
orientação e apoio.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Vítor Alberto Kerber pela orientação segura, pela amizade, pelo constante auxílio e dedicação durante as várias fases de realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela inestimável co-orientação;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela formação;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Contín, ao Prof. Dr. Rob Verpoorte (Universidade de Leiden – Holanda) e ao Prof. Dr. Valentim Emílio Uberti Costa (UFRGS – Porto Alegre) pela realização e cooperação nos estudos de espectroscopia de RMN;

Ao botânico Gert Hatschbach pela identificação do material vegetal;

Às Prof.<sup>as</sup> Maria Madalena Gabriel e Marilú Lopes (Laboratório de Toxicologia da UFPR) pela cooperação em estudos de espectroscopia de UV;

À Dr.<sup>a</sup> Marta Regina Tazoniero do Amaral e Dr.<sup>a</sup> Carmen Etsuko Kataoka (TECPAR) pelas cepas de bactérias fornecidas;

À Prof.<sup>a</sup> Wanda Moscalewsky e a funcionária Geni Peruzzo (Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR) pelo grande auxílio durante os testes de avaliação da atividade antibacteriana;

À Empresa Laboratórios Catarinense (Joinville – S.C.) pela possibilidade de uso do equipamento de CLAE;

Ao amigo João Luiz de Souza Carvalho pela ajuda prestada na realização das análises cromatográficas;

Ao pesquisador Dr. Celso Garcia Auer (EMBRAPA-FLORESTAS) pela grande contribuição, auxílio e dedicação prestados durante os testes de avaliação antifúngica;

Às amigas Miriam Machado Cunico e Deise Prehs Montrucchio pela amizade e apoio em todos os momentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas oferecido pela Universidade Federal do Paraná;

À família por todos os momentos;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1 GENERALIDADES SOBRE FLAVONÓIDES.....	5
3.1.1 Química e distribuição.....	5
3.1.2 Biossíntese.....	8
3.1.3 Farmacologia.....	11
3.2 GENERALIDADES SOBRE A FAMÍLIA LEGUMINOSAE E O GÊNERO <i>Acácia</i> .....	16
3.2.1 Aspectos gerais sobre a família Leguminosae-Mimosoideae.....	16
3.2.2 <i>Acacia longifolia</i> – Aspectos botânicos e distribuição.....	17
3.2.3 Enquadramento taxonômico da espécie.....	18
3.2.4 Química do gênero <i>acácia</i> – Ênfase a flavonóides.....	19
3.2.5 Algumas atividades biológicas encontradas em espécies de <i>Acacia</i> .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	25
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES.....	25
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES (MASSA ABSOLUTA).....	27
4.4 PROCESSAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	28
4.4.1 Isolamento das substâncias contidas nesta fração.....	28
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	30
4.5.1 Ponto de fusão.....	30
4.5.2 Espectroscopia de absorção no ultra violeta.....	31
4.5.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H.....	31
4.5.4 Espectroscopia de massa.....	31

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	33
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES (MASSA ABSOLUTA).....	39
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	39
5.2.1 Caracterização da substância AL1.....	39
5.2.2 Caracterização da substância AL2.....	46
5.2.3 Caracterização da substância AL3.....	53
5.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	56
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	62
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	62
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES E SUA NUMERAÇÃO.....	6
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DIVERSOS FLAVONÓIDES.....	7
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS GEOGRÁFICA ESPÉCIES DE <i>Acacia</i> .....	17
FIGURA 4 - ASPECTO GERAL DAS FLORES DE <i>Acacia longifolia</i> (Andr.) Willd.....	19
FIGURA 5 – SOHXLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	26
FIGURA 6 - DISPOSIÇÃO DOS DISCOS NA PREPARAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	36
FIGURA 7 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV PARA A SUBSTÂNCIA AL1.....	41
FIGURA 8 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc e NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL1 EM MeOH.....	41
FIGURA 9 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl <sub>3</sub> E AlCl <sub>3</sub> /HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL1 EM MeOH.....	41
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H PARA A SUBSTÂNCIA AL1.....	44
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSA PARA A SUBSTÂNCIA AL1.....	45
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 5-β-D-GALACTOSIL-NARINGENINA.....	46
FIGURA 13 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV PARA A SUBSTÂNCIA AL2.....	48
FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc e NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL2 EM MeOH.....	48
FIGURA 15 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl <sub>3</sub> E AlCl <sub>3</sub> /HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL2 EM MeOH.....	48
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H PARA A SUBSTÂNCIA AL2.....	51
FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSA PARA A SUBSTÂNCIA AL2.....	52
FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 5-β-D-GLUCOSIL-NARINGENINA.....	53
FIGURA 19 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV PARA A SUBSTÂNCIA AL3.....	55
FIGURA 20 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc e NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL3 EM MeOH.....	55
FIGURA 21 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl <sub>3</sub> E AlCl <sub>3</sub> /HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL3 EM MeOH.....	55
FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DA NARINGENINA.....	56

FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>Acacia longifolia</i> POR CLAE (CONCENTRAÇÃO 1,45 mg/ml). OS TEMPOS DE RETENÇÃO (ABCISSA) SÃO DADOS EM MINUTOS. A ABSORBÂNCIA (ORDENADA) É DADA EM AU.....	57
FIGURA 24 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL1. EQUAÇÃO DA RETA: $Y = A + BX$ ONDE $A = -60021$ E $B = 24558486,00884$ .....	58
FIGURA 25 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL2. EQUAÇÃO DA RETA: $Y = A + BX$ ONDE $A = -53704,66667$ E $B = 32856906,25$ .....	59
FIGURA 26 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL3. EQUAÇÃO DA RETA: $Y = A + BX$ ONDE $A = -113396$ E $B = 48198692,85714$ .....	60

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES.....	10
ESQUEMA 2 - FLUXOGRAMA DE PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES.....	27
ESQUEMA 3 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS FLAVONÓIDES.....	30

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO EM CLAE ANALÍTICA.....	32
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
TABELA 3 - TEOR DE SÓLIDOS ENCONTRADOS NO EXTRATO BRUTO E EM CADA UMA DAS FRAÇÕES.....	39
TABELA 4 - DADOS DE RMN <sup>1</sup> H PARA A SUBSTÂNCIA AL1.....	43
TABELA 5 - DADOS DE RMN <sup>1</sup> H PARA A SUBSTÂNCIA AL2.....	50
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20µl) DA SUBSTÂNCIA AL1.....	58
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20µl) DA SUBSTÂNCIA AL2.....	59
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20µl) DA SUBSTÂNCIA AL3.....	60
TABELA 9 - ÁREA DOS PICOS E CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	61
TABELA 10 - QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CLAE ANALÍTICA.....	62
TABELA 11 - RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA - MÉDIA ENTRE AS DUAS PERPENDICULARES FORMADAS PELO CRESCIMENTO MICELIAL DOS PATÓGENOS (mm) E INIBIÇÃO (%) DO HALO DE CRESCIMENTO NA FRAÇÃO TESTADA.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\delta$	Deslocamento
$\epsilon$	Absortividade Molar
$J$	Constante de Acoplamento
$M$	Multiplicidade
AcOEt	Acetato de Etila
AL1	Substância Isolada 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenina
AL2	Substância Isolada 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenina
AL3	Substância Isolada Naringenina
$\text{AlCl}_3$	Cloreto de Alumínio
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CF	Concentração da Fração Acetato de Etila
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida em Coluna
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
cm	Centímetro

CS	Concentração da Substância Isolada
dd	Duplo Dubleto
F1	Fração Diclorometano
F2	Fração Acetato de Etila
g	Gramas
h	Hora
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
log	Logaritmo
MeOH	Metanol
MF	Massa da Fração
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MP	Massa da Planta
MSI	Massa da Substância Isolada
MHz	Mega-Hertz
NaOAc	Acetato de Sódio
NaOMe	Metóxido de Sódio
nm	Nanômetro
OH	Hidroxila

ppm	Partes por Milhão
PSI	Porcentagem de Substância Isolada
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

## RESUMO

*Acacia longifolia* (Andr.) Willd., é um arbusto, de 3-4 m de altura. Arbusto originário da região leste-tropical da Austrália, muito cultivado para fixar dunas em terrenos íngremes, sujeitos a erosão. *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. foi investigada visando à identificação dos flavonóides majoritários em suas flores e a avaliação de atividades antimicrobianas. Através de métodos cromatográficos, três flavonóides foram isolados a partir da fração acetato de etila. Estes foram identificados através de análises espectroscópicas e propriedades físico-químicas como uma flavanona a naringenina, e dois de seus heterosídeos, a 5-β-D-galactosil-naringenina e 5-β-D-glucosil-naringenina. Usando CLAE, os flavonóides isolados foram quantificados no material vegetal, apresentando teores mínimos de 0,582 % (m/m) de 5-β-D-galactosil-naringenina, 0,2% (m/m) de 5-β-D-glucosil-naringenina e 0,018 % (m/m) de naringenina. A fração acetato de etila a uma concentração de 500 ppm, mostrou uma significativa atividade antifúngica, inibindo 30% do crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. Também houve inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* (15,9%) e de *Fusarium oxysporum* (10,5 %). O extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e diclorometano foram testadas contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* em concentrações até 1000 µg, mas nenhuma atividade foi detectada.

## ABSTRACT

*Acacia longifolia* (Andr.) Willd., is a shrub, (3-4 m in height). Originally from Australia east-tropical region, it is cultivated to firm dunes in steep ground. *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. was investigated to evaluating anti-microbial activities and to identify flavonoids in its flowers. Three flavonoids were isolated by chromatographics means from the ethyl acetate fraction. The flavonoids were identified by spectral analysis and physical-chemical properties given Naringenin, a flavanone and two of its glycosides, 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenin and 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenin. Using an HPLC system, the isolated flavonoids were quantified in the plant material, giving minimal values of 0,582 % (w/w) for 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenin, 0,2 % (w/w) for 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenin and 0,018 % (w/w) for naringenin. At the concentration of 500 ppm the ethyl acetate fraction showed a remarkable anti-fungi activity inhibiting 30% of the micelial growing from *Rhizoctonia* sp.. It also inhibit the micelial growing of *Colletotrichum acutatum* (15,9%) and *Fusarium oxysporum* (10,5%). The crude ethanolic extract, the dicloromethane and the ethyl acetate fractions were tested againt strains of *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Escherichia coli* at concentrations up to 1000  $\mu$ g giving no activity.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca do homem por soluções que pudessem aplacar suas dores e doenças foi sempre incessante e remonta seu aparecimento na face da Terra. No início, com tal objetivo, ele se valia da natureza como fonte de recursos terapêuticos. Índícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações, onde o homem primitivo ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo espécimes com ação tóxica ou medicinal e transmitindo a experiência acumulada por inúmeras gerações (SIMÕES *et al.*, 1986).

Várias plantas com propriedades terapêuticas, foram em sua grande maioria, descobertas empiricamente e, com base nestes conhecimentos acumulados pela medicina popular, foram desenvolvidos alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES *et al.*, 1986).

Atualmente diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos em várias espécies vegetais pela intensa produção de metabólitos secundários, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO & BRITO, 1993).

Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

Nesta perspectiva, a botânica, a química e a farmacologia abrangem conhecimentos indispensáveis para a utilização segura de plantas medicinais, mostrando que a busca sistemática de novos medicamentos tem sido realizada por inúmeras abordagens de estudo. Desta forma, uma abordagem interdisciplinar, na pesquisa de novos medicamentos, representa, de modo inegável, a alternativa mais eficaz e promissora para a obtenção e alcance deste objetivo (Di STASI, 1996).

Contudo a vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais (ELISABETSKY, 1986).

Felizmente nas últimas décadas o estudo de plantas medicinais evoluiu muito, principalmente do ponto de vista químico com o desenvolvimento de novas técnicas

cromatográficas e de determinação estrutural, também do ponto de vista biológico e farmacológico onde foram desenvolvidas técnicas rápidas de bioensaios para a avaliação de extratos e produtos isolados (NUNES, 1996).

Até o momento, ainda não se conhece quase nada sobre a composição química de 99,6% das plantas de nossa flora, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies (MING, 1996); embora estas sejam largamente exploradas como fonte de matérias primas (GOTTLIEB & BORIN, 1997). Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada ainda não foram estudados quanto a suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras (DI STASI, 1996).

Das diversas espécies vegetais existentes, apenas 10 a 12 % foram realmente estudadas com critérios científicos, as quais geraram novas formulações semi-sintéticas e sintéticas, partindo dos seus princípios ativos (WAGNER & WOLF, 1977).

Desta forma conclui-se que as plantas representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL & WANI, 1996).

Muitas das espécies vegetais estudadas, têm sido vistas como representantes de substâncias com grande aplicabilidade na agricultura. Uma das aplicabilidades estudadas tem sido a atividade fungitóxica, potencialmente segura e economicamente viável, uma vez que no Brasil, há grande diversidade botânica (STANGARLIN *et al.*, 1999). Além disso, muitos grupos de pesquisas tem direcionado suas buscas a plantas com atividades antibacterianas relevantes, tendo-se desse modo, o controle de inúmeras patologias em seres humanos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (ALVES *et al.*, 2000).

Tendo em vista o tema apresentado, o presente trabalho foi delineado com o objetivo principal de investigar a presença dos flavonóides majoritários nas flores de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd., das quais já foram isolados uma flavanona de seus hidrolisados por MARINI-BETTOLO & FALCO (1951), comprovada em sua forma livre e conjugada com uma molécula de glucose na hidroxila C<sub>5</sub> por KERBER (1993). Além deste objetivo, tornou-se interessante avaliar possíveis atividades

antimicrobianas (antibacterianas e antifúngicas) presentes nos extratos obtidos das flores de *Acacia longifolia*.

Elegeram-se os flavonóides como objeto do estudo, por ser comum em espécies de *Acacia* e pela grande quantidade de ações farmacológicas atribuídas a este grupo do metabolismo secundário das plantas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Visando atender as propostas citadas, este trabalho tem como interesse a investigação de novos produtos de origem vegetal com potencial atividade biológica, pretendendo-se realizar um estudo fitoquímico e de atividades antimicrobianas das flores de *Acacia longifolia*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a composição química do gênero *Acacia* com ênfase ao grupo flavonoídico.
- Isolar e identificar os flavonóides majoritários das flores de *Acacia longifolia*.
- Avaliar possível atividade antibacteriana dos extratos obtidos.
- Avaliar possível atividade antifúngica dos extratos obtidos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GENERALIDADE SOBRE FLAVONÓIDES

##### 3.1.1 Química e distribuição

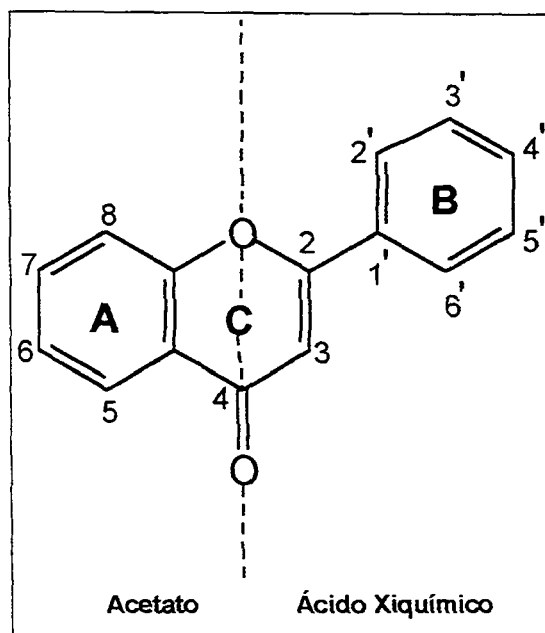
Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Mais de 2000 destes compostos são atualmente conhecidos, sendo que, aproximadamente 500 ocorrem em seu estado livre (EVANS, 1996).

O termo flavonóide tem suas raízes na palavra latina *flavus* (amarelo), sendo pigmentos vegetais que contém 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental apresentando a configuração  $C_6-C_3-C_6$  com um anel benzo- $\gamma$ -pirona. Por conveniência os anéis são classificados em A, B e C (MARKHAM, 1982) e recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de uma linha ( ' ) para o núcleo B (ZUANAZZI, 1999) (Figura 1).

Os flavonóides são derivados da 2-fenil- $\gamma$ -cromona, com um segundo anel aromático B, podendo estar nas posições 3 e 4 (ZUANAZZI, 1999). São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides surgindo a partir da combinação de duas rotas de biossíntese. O anel A provém da via acetato enquanto o anel B origina-se da via do ácido xiquímico (Figura 1). Os três átomos de carbono que ligam o anel A e B são incorporados a partir do fosfo-enol-piruvato (SAMUELSSON, 1992).

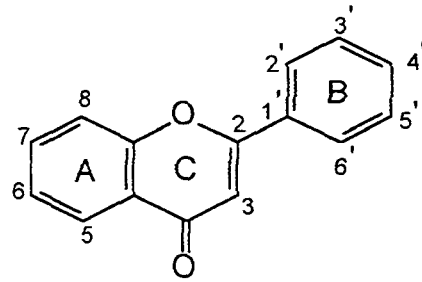
Os flavonóides ocorrem tanto em estado livre (aglicona ou genina) como combinados com açúcar (heterosídeo) ou também sob a forma dimérica (biflavonóides). A maioria destes heterosídeos são O-heterosídeos, mas C-heterosídeos também são freqüentemente encontrados (BRUNETON, 1991). Os flavonóides aglicônicos são classificados de acordo com o estado de oxidação do anel heterocíclico C que conecta os dois anéis benzênicos A e B (DEY & HARBONE, 1997).

FIGURA 1 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES E SUA NUMERAÇÃO.

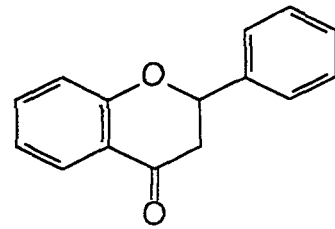


Segundo DEY & HARBONE (1997) agliconas flavonoídicas ocorrem em uma variedade de formas estruturais: (a) flavonas, (b) flavanonas, (c) flavonóis, (d) di-hidro-flavonóis, (e) chalconas, (f) auronas, (g) di-hidro-chalconas, (h) isoflavonas, (i) isoflavanonas, (j) neoflavonas, (k) leucoantocianidinas e (l) antocianidinas (Figura 2).

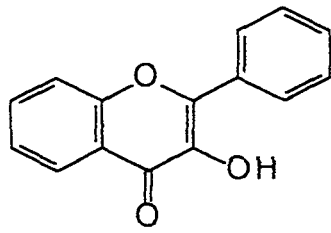
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DIVERSOS FLAVONÓIDES.



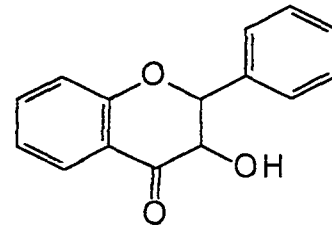
Flavona



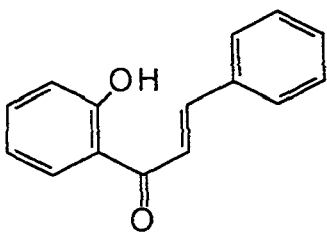
Flavanona



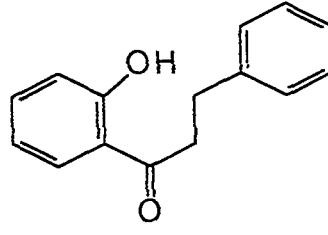
Flavonol



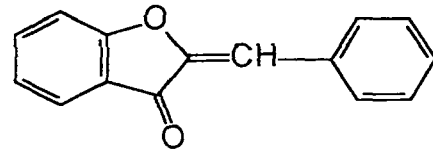
Di-hidro-flavonol



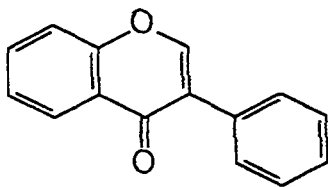
Chalcona



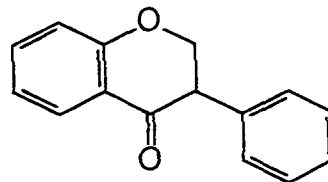
Di-hidro-chalcona



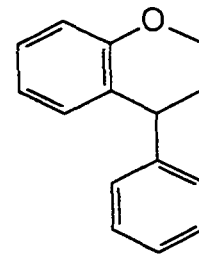
Aurona



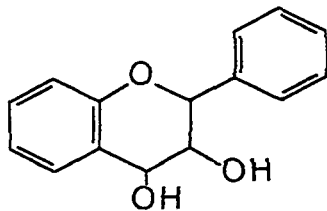
Isoflavona



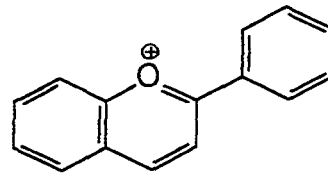
Isoflavanona



Neoflavona



Leucoantocianidina



Antocianidina

Os flavonóides se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal (BRUNETON, 1993) e são abundantes em diversas famílias destacando-se Polygonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Umbeliferae e Compositae, onde são utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (EVANS, 1996). Estão ausentes nas algas, porém aparecem nas briófitas (BRUNETON, 1991) e em todas as plantas superiores (SAMUELSSON, 1992). Eles ocorrem em todas as partes do vegetal incluindo folhas, raízes, cerne, casca, pólen, flores, néctar, bagas e sementes (MARKHAM, 1982). As agliconas são mais freqüentes nos tecidos lenhosos (DOMINGUEZ, 1973).

Segundo HARBONE (1988), as flavonas e flavonóis estão amplamente distribuídos em todas as plantas vasculares, enquanto as isoflavonas e biflavonóis são encontrados apenas em algumas famílias.

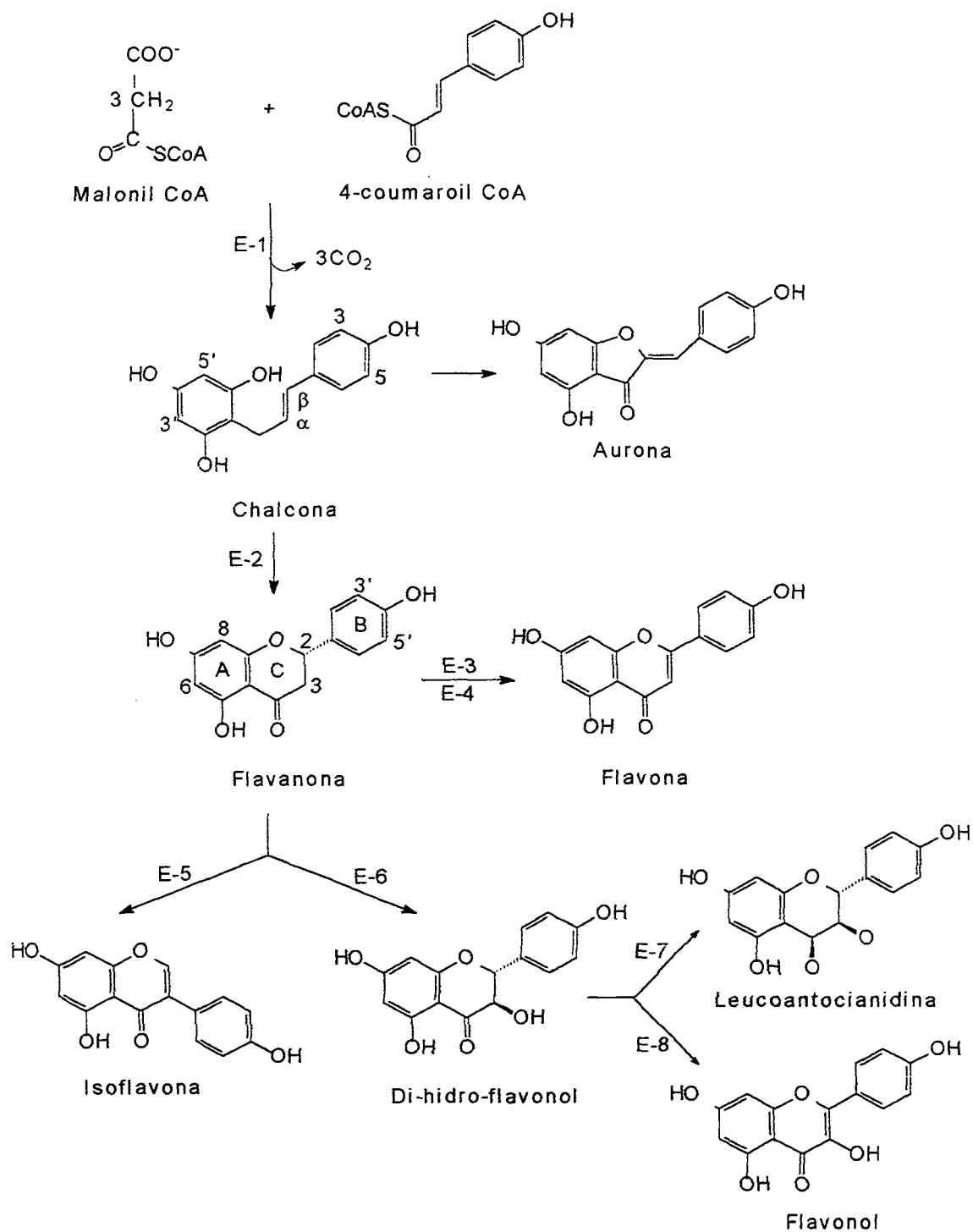
### 3.1.2 Biossíntese

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são derivadas desta através de várias outras rotas (MARKHAM, 1982). A chalcona ou chalcona-naringenina é formada pela condensação de 4-coumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA através da ação da chalcona sintase, enzima limítrofe da síntese de flavonóides, pois catalisa a formação do esqueleto C<sub>15</sub> e deste modo a entrada de hidroxicinamatos dentro da biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. As auronas são derivadas diretamente do intermediário chalcona, por um sistema enzimático ainda desconhecido. A flavanona naringenina é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e di-hidro-flavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma dupla ligação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavona sintase: flavona sintase I (uma dioxigenase) e flavona sintase II (uma monoxigenase). Uma monoxigenase dependente da citocromo P-450 também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os di-hidro-flavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase. Estes mesmos podem entrar em outra via para a formação das antocianidinas e, uma di-hidro-flavonol 4-redutase

dependente de NADPH catalisa a formação de flavan-3,4-cis-dióis, estrutura das leucoantocianidinas (DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997). O esquema 1 sumariza as reações enzimáticas envolvidas na produção de várias classes de flavonóides.

Outras modificações podem ocorrer em vários estágios, resultando em: hidroxilação adicional (ou redução); metilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; isoprenilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; metilação de grupos di-hidroxilas em posição orto; dimerização (para produzir biflavonóides); formação de bissulfatos; e a mais importante, glicosilação de grupos hidroxila (para formar os flavonóides O-glucosídicos) ou do núcleo flavônico (para formar flavonóides C-glucosídicos) (MARCANO *et al.*, 1991; DEWICK, 1998).

## ESQUEMA 1 - BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES.



E-1: Chalcona sintase, E-2: Chalcona isomerase, E-3: Flavona sintase I (2-hidroxi flavanona sintase), E-4: Flavona sintase II (2-hidroxi flavanona sintase), E-5: Isoflavona sintase (2-hidroxi isoflavona sintase), E-6: Flavanona-3-hidroxilase, E-7: Di-hidro-flavonol/ di-hidro-flavona 4-redutase e E-8: Flavonol sintase.

### 3.1.3 Farmacologia

Em 1938 Rusznyak e Szent-Györgi, observaram que preparações contendo ácido ascórbico, obtido de fontes naturais, eram mais eficazes no tratamento de lesões capilares do que preparações contendo ácido ascórbico puro, obtido das mesmas fontes. Posteriormente Rusznyak e Szent-Györgi, isolaram de *Capsicum annuum* e *Citrus limon* uma das substâncias que acompanhavam o ácido ascórbico, e a chamaram de hesperetol (uma flavona), hesperidina, citrina ou simplesmente vitamina P (EVANS, 1996). Esse composto atuava sobre a fragilidade capilar, diminuindo a permeabilidade dos mesmos e reforçando a sua resistência (BRUNETON, 1993).

O emprego de flavonóides em terapêutica é vasto e empírico (ZUANAZZI, 1999). Muitas pesquisas têm enfatizado no últimos anos os efeitos terapêuticos de vários destes compostos, alguns dos quais, devido a importância foram relatados nesta revisão.

Na inflamação, apigenina e luteolina de *Chamomilla recutita* diminuíram a infiltração leucocitária (DELLA LOGIA *et al.*, 1986). Esses flavonóides, em sua forma glucosídica, foram ativos anti-inflamatórios de ação tópica (SINGLA & PATHAK, 1990) e oral (SINGLA & PATHAK, 1989).

Nepetrina que possui um efeito antipirético, também foi relatada como um potente anti-inflamatório, agindo diretamente pelo antagonismo de mediadores como a bradiquinina e a angiotensina (ARGAWAL, 1982). Uma outra ação anti-inflamatória, por inibição da liberação do ácido araquidônico para as membranas foi observada nos flavonóides crisina, naringenina (TONDERA *et al.*, 1994), apigenina, luteolina e quercetina (MOON *et al.*, 1999).

A quercetina também foram atribuídas funções anti-inflamatórias por inibição de células mastocitárias secretoras de histamina (BENETT *et al.*, 1981) atuando provavelmente na quelatação de cobre (MIDDLETON & DRZEWIECKI, 1982).

Muitos flavonóides apresentaram grande vantagem sobre muitos anti-inflamatórios clássicos por mostrarem um efeito não ulcerogênico. Compostos como a gossipina (PARMAR & GHOSH, 1976) e naringenina (PARMAR, 1983; ABOUL-ENEIN, 1984) apresentaram uma potencial atividade protetora contra úlceras *in vivo*. Outros flavonóides se destacaram nesta mesma atividade ou pela inibição da catecol-O-

metil-transferase, dentre eles a miricetina, a quercetina e o hiperosídeo (BARNAULOV *et al.*, 1983) ou por inibição do crescimento da *Helicobacter pylori* como o campferol (HASHIMOTO *et al.*, 1999), hesperitina, naringenina e diosmetina (BAE *et al.*; 1999) os quais revelaram intensa proteção gástrica.

Envolvidas na inflamação aguda e alergia estão a apigenina, luteolina, quercetina-3-O-rhamnosídeo (PIERONI *et al.*, 1996) e rutina (SHAHAT *et al.*, 1996) as quais inibiram a via clássica do sistema complemento.

Significantes atividades antialérgicas foram detectadas em nobiletina em teste de anafilaxia cutânea e bioensaio com células mastocitárias (USHIO & YUI, 1984), em quercetina e seus derivados metilados como a apigenina (YUTAKA & USHIO, 1985) e em campferol e naringenina, onde foram observadas atividades inibitórias da lipoxigenase ou da fosfolipase A<sub>2</sub> (WELTON *et al.*, 1986). MIDDLETON *et al.* (1987) estudando os efeitos de vários citrus flavonóides sobre a liberação de histamina, estimulada por vários secretagogos comprovaram que a apigenina, luteolina, tangeretina, sinestesina, nobiletina e campferol foram ativos como inibidores da liberação de histamina pelo basófilo e liberação de betaglucuronidase em neutrófilos por meio de processos de atividade antialérgica *in vivo*.

SCHWARTZ & MIDDLETON (1984) estudando atividades antitumorais nas várias classes de flavonóides relataram a quercetina como a que inibiu *in vitro* a geração e efeitos ou a função alo-antígenos específicos citotóxicos em células T linfocitárias, evidenciando que a presença de dupla ligação nas posições C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> nas agliconas de flavonas ou flavonóis, um grupo ceto em C<sub>4</sub>, hidroxilação no anel B e/ou um grupo hidroxil livre em C<sub>3</sub> podem estar associados a esta atividade. Luteolina, nobiletina e tangeretina também mostraram-se eficazes inibindo a proliferação de várias linhagens de células tumorais por indução de apoptose (KAWAII *et al.*, 1999).

Estudos indicaram a genisteína, isoflavona conhecida por ser um potente fitoestrogênio, como capaz de impedir a neovascularização que leva a proliferação de células tumorais e doenças angiogênicas *in vitro* (FOTSIS *et al.*, 1995), regular a proliferação de células epiteliais na mama (BARNES *et al.*, 1996; PETERSON & BARNES, 1996), inibir a atividade dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea, podendo ser empregada no tratamento de osteoporose e/ou câncer ósseo (BARNES & BLAIR, 1996) e reduzir o câncer de próstata *in vivo* (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

A genisteína e daidzeína, em especial, tem sido utilizadas como o mais novo método de prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa e síndrome pré-menstrual por reduzir os níveis de estrogênios endógenos (GORBACH *et al.*, 1994; MOLTENI *et al.*, 1995), atuando supostamente como antagonista do receptor de estrogênio bloqueando seus efeitos (WISEMAN, 1996).

Atividade virustática foi detectada em quercetina e di-hidro-quercetina contra *Herpes simplex tipo I* e Pólio vírus (MUSCI, 1985). KAUL *et al.* (1985) relataram a atividade de quercetina, naringenina e hesperidina sobre a infectividade e replicação de *Herpes vírus tipo I* (HSV-1), *Parainfluenza vírus tipo III* (Pf-3) em culturas *in vitro*. GONZALEZ *et al.* (1990) relataram a 3-metil-quercetina como inibidora da replicação do poliovírus pelo bloqueio da síntese do RNA viral. Flavonóides também foram analisados como agentes anti-HIV, a inibição da replicação do vírus foi verificada em apigenina-7-O-β-D-glicopiranosídeo (TANG *et al.*, 1994) e acacetina-7-O-β-D-galactopiranosídeo (HU *et al.*, 1994). HU *et al.*, (1994) indicaram ainda que flavonóides com grupos hidroxil em C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub> e com uma dupla ligação em C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> possuíam uma potente atividade inibidora da proliferação do vírus HIV.

Spinosina, swertisina e acilpinosina isoladas de *Zizyphus vulgaris* apresentaram atividade neuroléptica (SHIN *et al.*, 1981).

Atividade analgésica foram significantes em crisina, morina e rutina em análises *in vivo* (SAMBANATHAN *et al.*, 1985).

Uma possível atividade antimalárica foi relatada em quercetina quando testada contra *Plasmodium falciparum in vitro* (KHALID *et al.*, 1986).

Alguns flavonóides destacaram-se por serem inibidores de muitas enzimas como a aldose redutase, cujo aumento está envolvido em complicações diabéticas (VARMA & KINOSHITA, 1976; OKUDA *et al.*, 1984); Ca<sup>2+</sup> ATPase, presente no retículo sarcoplasmático (FEWTRELL, 1977); fosfodiesterase, envolvida com a regulação de AMP<sub>c</sub> e GMP<sub>c</sub> (RUCKUSTUHL *et al.*, 1979; NIKAIDO *et al.*, 1988); cicloxigenase (BAUMANN *et al.*, 1980); lipoxigenase (YOSHIMOTO *et al.*, 1983; BEZAKOVA *et al.*, 1996) e xantina oxidase, envolvida com hiperuricemia (BEILER & MARTIN, 1951; NORO *et al.*, 1989), hepatite, tumores em tecido cerebral (CHANG *et al.*, 1993) e efeitos oxidantes (CHIMANGA *et al.*, 1999 e). Outras enzimas como a citocromo P-450 presente nos microsomas de fígado de rato (SOUSA & MARLETA, 1985), tirosina proteína quinase e fosforilase quinase (SRIVASTAVA & CHASSON,

1986) foram fortemente inibidas pela quercetina, ocasionando uma potencial proteção contra a lipoperoxidação (UBEDA *et al.*, 1995).

Derivados de flavonas, crisina e apigenina junto com seus dímeros exibiram atividade ansiolítica sem apresentar efeitos sedativos (CASSELS *et al.*, 1995).

Hypericina, o principal constituinte do *Hypericum perforatum* foi relatado como princípio ativo para a atividade antidepressiva, porém alguns componentes puros, a protohypericina e a pseudohypericina produziram notável atividade ansiolítica por ativação dos receptores benzodiazepínicos (VANDENBOGAERDE *et al.*, 2000).

Eupatolina e arcapalina isoladas de *Artemisia capillaries* exibiram atividades coleréticas, diminuindo as lesões causadas por tetracloreto de carbono em ratos (GOTO & KOMIYA, 1983). SOICHE & LENG-PESCHALOW (1987) estudando a atividade antihepatotóxica dos componentes flavonoídicos de *Baccharis trimera* em ratos, verificou que quercetina, luteolina, apigenina e hispidulina, principalmente esta última, eram potentes hepatoprotetores.

Efeitos no sistema vascular central foram relatados em astragalina, glucosídeos do campferol, isoquercetina, glucosídeos de quercetina (KENJI *et al.*, 1987) e fisetina (LIN *et al.*, 1994) os quais mostraram atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA) por dose-dependente podendo ser utilizada como anti-hipertensivo.

No sistema vascular central citou-se a ação da quercetina como inibidora da agregação plaquetária, assim como a ação da fisetina, da di-hidro-quercetina (BERETZ *et al.*, 1981), rutina e toxerutina (SWEES *et al.*, 1985) e 3-metil-quercetina (LAEKMAN *et al.*, 1986). Em 3-metil-quercetina os efeitos cronotrópicos e antiarrítmicos (LAEKMAN *et al.*, 1986) e em vitexina, rutina e hiperosídeo os efeitos para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (GAO *et al.*, 1994) foram bem acentuados em ensaios *in vivo*.

Flavonóides glucosídicos de quercetina encontrados no extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, tem sido relatados no tratamento de desordens cerebrais como mal de Alzheimer e hipóxia neuronal, etiologias associadas ao estresse oxidativo (WADSWORTH & KOOP, 2001)

Quercetina, luteolina, cinarosídeo, haplogenina-7-O-glucosídeo, haplosídeo A, pectolinarigenina e hispidulina reduziram o colesterol, triglicerídeos e  $\beta$ -lipoproteínas produzindo amplos efeitos antiateromatosos (SYROV *et al.*, 1985). Alguns

flavonóides glucosídicos, como a diosmetina e palustrosídeo destacaram-se nas propriedades hipolipidêmica e fortalecedora capilar (ANDREEVA *et al.*, 1987).

Em quelina (UBEDA & VILLAR, 1989) e nos glucosídeos de quercetina (LOZOYA *et al.*, 1994) foram determinadas ações espasmolíticas. Quelina também mostrou ser um potente antiespasmódico e vasodilatador coronário provavelmente devido a inibição do fluxo de cálcio (UBEDA & VILLAR, 1989).

Naringenina e luteolina também se mostraram potentes vasodilatadores e relaxantes musculares *in vivo* (ROJAS *et al.*, 1996).

Flavonóides mostraram-se notáveis em propriedades antibacterianas e antifúngicas (EVANS, 1996).

MORI *et al.* (1987) relataram que um anel B 3',4',5'-trihidroxiado e C<sub>3</sub> hidroxiado são necessários para esta atividade. MORI *et al.* (1987) ainda pesquisaram a atividade em várias classes de flavonóides e concluíram que a síntese de DNA foi predominantemente inibida por flavonóides ativos em *Proteus vulgaris* (Gram-negativo), enquanto a síntese de RNA foi inibida em *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo).

Potentes atividades antifúngicas foram observadas em quercetina e campferol juntamente com seus glucosídeos, rutina e isoquercetina (BESCHIA *et al.*, 1982).

Os polifenólicos naturais muito comuns nos vinhos permitem a varredura de radicais livres, em especial os superóxidos e as hidroxilas, protegendo contra doenças vasculares e certas formas de câncer (DEWICK, 1998). HUSSAIN *et al.* (1987) relataram que a atividade antioxidante em flavonóides aumenta com o aumento do número de grupos hidroxilas substituíntes no anel aromático B.

Estudos comprovaram que a quercetina, principal flavonóide presente em vinhos tintos, funciona como um potente antioxidante, inibindo a oxidação das lipoproteínas plasmáticas (McANLIS *et al.*, 1999) e antagonizando os efeitos do peróxido de hidrogênio em alguns modelos celulares, protegendo contra várias doenças neurodegenerativas por diminuição do cálcio intracelular (WANG & JOSEPH, 1999).

Luteolina (IGILE *et al.*; 1994), naringenina, rutina, fisetina (DUKIC *et al.*, 1994), as isoflavonas genisteína e daidzeína, encontradas principalmente em Leguminosas, também foram relatadas como notáveis antioxidantes de origem

natural (NAGEM *et al.*, 1993; ASAD *et al.*, 1998), assim como o campferol (JUNG *et al.*, 1999).

### 3.2 GENERALIDADES SOBRE A FAMÍLIA LEGUMINOSAE E O GÊNERO *Acácia*

#### 3.2.1 Aspectos gerais sobre a família Leguminosae-Mimosoideae

A família Leguminosae compreende cerca de 600 gêneros e 12.000 espécies, formando a segunda maior família do Reino Vegetal (EVANS, 1996).

Ocorrem em todas as partes do planeta, com exceção das regiões Ártica e Antártica, difundidas pelas regiões tropicais e subtropicais, especialmente zonas áridas ou semi-áridas; somente poucas espécies estendem-se distintivamente em zonas temperadas (CRONQUIST, 1981).

MARCHIORI (1997) citou que a taxonomia das Leguminosas tem gerado muitas controvérsias, alguns autores como SCHULZE-MENZ (1964) e BURKART (1952, 78, 79, 87), preferem manter a unidade da família (*Leguminosae* ou *Fabaceae*), reconhecendo para as mesmas as subfamílias *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* e *Faboideae* (ou *Papilionoideae*); outros elevam as três subfamílias ao grau de família (*Mimosaceae*, *Caesalpinoideae*, *Fabaceae* ou *Papilionaceae*), reunindo-as na Ordem *Leguminales* (HUTCHINSON, 1964) ou *Fabales* (CRONQUIST, 1968; TAKHATAJAN, 1969).

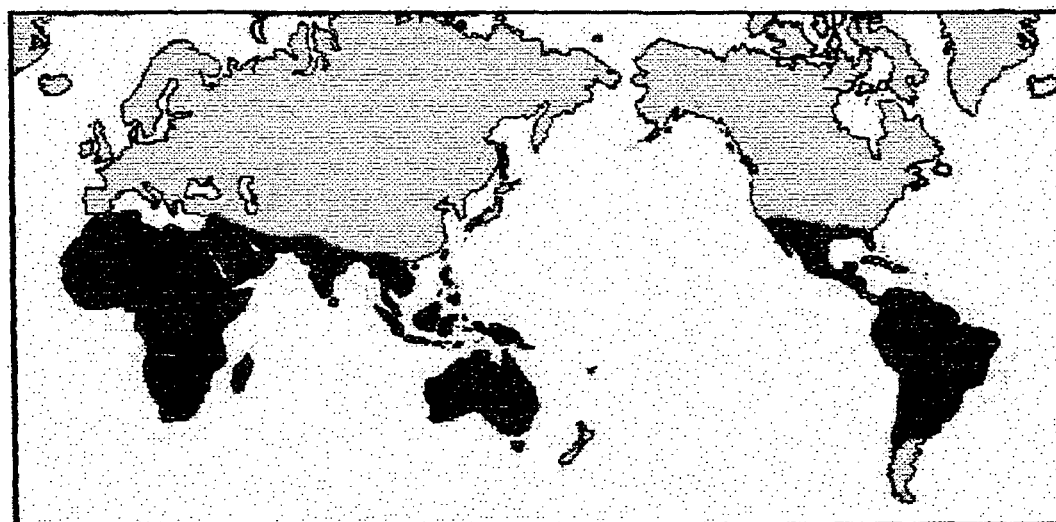
*Mimosoideae* é a menor entre as subfamílias de Leguminosas compreendendo de 50 a 60 gêneros (MARCHIORI, 1997). Seus membros são árvores ou arbustos; folhas geralmente bipinuladas com muitos numerosos e pequenos folíolos, flores regulares, cálice geralmente gamossépalo, estames iguais em número as pétalas ou duas vezes o seu número, o fruto é um legume (BARROSO, 1986; JOLY, 1998; CRONQUIST, 1981). Os maiores gêneros são *Acácia* com 700 a 800 espécies e *Mimosa* com 450 a 500 espécies (EVANS, 1996).

O gênero *Acácia*, com cerca de 1.200 espécies, é o mais numeroso da família (ELIAS, 1991), compreendendo aproximadamente 800 espécies na Austrália; também são muito numerosas na África e América onde são caracterizadas pela presença de espinhos estipulares (MARCHIORI, 1997).

Historicamente, o gênero *Acácia* é muito conhecido pela produção de goma

arábica, obtida dos talos e ramos de *Acacia senegal* e outras espécies de *Acacia*; esta chegou ao Egito procedente do Golfo de Aden no século XVII a.C. e nos trabalhos de Teofrasto é citada como um produto do alto Egito (EVANS, 1991). Ainda neste contexto, tem-se a acácia negra (*Acacia mearnsii*, Willd.), a qual possui grande interesse comercial. Esta no Estado do Rio Grande do Sul é caracterizada como a leguminosa florestal mais cultivada que além de produzir boa goma do tipo goma arábica, é importante na extração de taninos (presentes na casca em torno de 30% a 40%) e madeira ou carvão vegetal (TANAGRO, 1992).

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE *Acacia*



Fonte: <http://www.anbg.au/acacia/acacia.html>

### 3.2.2 *Acacia longifolia* – Aspectos botânicos e distribuição

*Acacia longifolia* (Andr.) Willd., é um arbusto ou árvore pequena, de 3-4 m de altura com ramos pendentes; filódios sublanceolados, oblíquos, inteiros, verde azulados, 2-3 nervados na base e com glândulas no ápice, 7-14 cm de comprimento, aglomerados no ápice dos ramos; flores amarelas, dispostas em espigas geminadas axilares, compridas e cilíndricas (BURKART, 1979; CORREA, 1984) (Figura 4).

*Acacia longifolia* recebe os nomes comuns de acácia trinervis, mimosa das flores amarelas ou acácia da Austrália (BURKART, 1979).

Sua etimologia vem do grego, *aki* que significa “ponta”, se referindo aos espinhos encontrados nas espécies africanas, uma vez que as australianas não os

possui, *Longifolia* vem do latim *longus* e *folia* os quais significam “folhas longas” (CÁCERES, 1999).

Arbusto originário da região leste-tropical da Austrália, frequentemente cultivado como planta de adorno ou sombra (BENTHAM, 1875). Muito utilizada como fixadora de dunas em terrenos íngremes, sujeitos a erosão (BURKART, 1979).

### 3.2.3 Enquadramento taxonômico da espécie

Segundo ENGLER (JOLY, 1998)

- Divisão: Angiospermae
- Classe: Dicotyledoneae
- Subclasse: Archichlamydeae
- Ordem: Rosales
- Sub-Ordem: Leguminosineae
- Sub-Família: Mimosoideae
- Família: Leguminosae
- Tribo: Acacieae
- Gênero: *Acacia*
- Espécie: *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.

FIGURA 4 - ASPECTO GERAL DAS FLORES DE *Acacia longifolia* (Andr.) Willd.



Fonte: [http://www.anbg.gov.au/images/photo\\_cd/30160241319/068.html](http://www.anbg.gov.au/images/photo_cd/30160241319/068.html)

### 3.2.4 Química do gênero *Acácia* – Ênfase a flavonóides

A revisão da literatura (Chemical Abstract de 1936 a 2000, Biological Abstract de 1937 a 2000 e outras bases de dados) mostrou uma grande variedade de metabólitos secundários, predominando os flavonóides. Dentre os outros grupos de substâncias também encontrados em plantas deste gênero destacam-se: cumarinas, taninos, glicosídeos cianogênicos, alcalóides e esteróides. Para efeitos deste trabalho focalizamos apenas a classe dos flavonóides.

Em *Acacia longifolia* MARINI-BETTOLO & FALCO (1951), relataram a existência de naringenina em seus hidrolisados, comprovada por KERBER (1993) o qual também detectou a presença de seu 5-glucosídeo.

Estudos posteriores em raízes de *Acacia longifolia*, revelaram a presença de uma nova flavanona com rara oxigenação em seu anel B, de estrutura estabelecida como 5,2',5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavanona (ANAN, 1997).

Naringenina também foi detectada nas cascas de *Acacia nilotica* por KHALID *et al.* (1989).

Um estudo químico com a espécie *Acacia catechu* levou ao isolamento dos flavonóides campferol, quercetina, iso-rhamnetina, di-hidro-campferol (PARIS, 1953; DESHPANDE & PATIL, 1981), quercetina-3-O-rhamnosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-arabinofuranosídeo (SHARMA *et al.*, 1997), 3-metilquercetina e di-hidro-quercetina (SHARMA *et al.*, 1999).

As flores de *Acacia papova* apresentaram a rutina (NAUCHINI, 1963).

No pólen de *Acacia dealbata* foram isolados a rutina, a quercetina, a robinetina, a miricetina e a naringenina-5-diglucosídeo (TAPPI *et al.*, 1955; SPADA & CAMERONI, 1956); nas flores desta mesma espécie ainda foi relatada a presença de 6'-O-glucosil-naringenina-chalcona (IMPERATO, 1967) e 6'-O-diglucosil-naringenina-chalcona, além da presença de uma aurona, o cernuosídeo (IMPERATO, 1982).

IMPERATO (1978) já havia identificado a 4-O-glucosil-naringenina-chalcona em *Acacia cyanophylla*.

Luteolina, uma flavona tetrahidroxilada, foi isolada das vagens de *Acacia leucophloea* (KHAN *et al.*, 1990), enquanto das flores foram isoladas a miricetina, a 3'-hidroxi-7-metoxiisoflavona, apigenina e seu derivado glucosilado, o 8-C-glucosil-apigenina (VALSAKUMARI & SULOCHANA, 1991), a quercetina, a quercitrina, o campferol e a rutina (RAO *et al.*, 1991). Alguns desses flavonóides aglicônicos, a quercitrina em *Acacia myrtifolia* (EADE *et al.*, 1973) e principalmente a apigenina, a rhamnetina e a fisetina foram reveladas em *Acacia aneura* (SALEEM *et al.*, 1992).

Em estudos com as folhas de *Acacia melanoxylon*, foi comprovada a existência de um hiperosídeo, identificado como 3-D-galactosil-quercetina (FALCO & JUAN, 1964), também foram identificados o (-)-2,3-cis-3',4',7,8-tetrahidroxidihidroflavonol, o (±)-2,3-trans-3',4',7-trihidroxi-5-metoxidihidroflavonol e o (±)-2,3-trans-3',4',7,8-tetrahidroxidihidroflavonol (FOO, 1987). Posteriormente FOO (1989) estudando a mesma espécie, isolou o único representante dimérico nesta, um [4-O-4]-biflavonóide acoplado, o [4-O-4]-BIS(2,3-cis-3,4-trans-3,3',4',7,8-

pentahidroxi flavan e o seu isômero 2,3-cis-3,4-trans-3,3,4',7,8-pentahidroxi flavan.

Das folhas de *Acacia saligna* foram isolados o 3-glucosil-campferol, a 3-glucosil-quercetina, 3-glucosil-miricetina (EL SISSI & EL SHERBEINY, 1967), a 7-O- $\beta$ -D-glucosil-naringenina, a naringenina, a 6-C-glucosil-naringenina, a quercetina e a quercitrina (EL-SHAFAE & EL-DOMIATY, 1998).

De *Acacia exiophylla* foi isolado um derivado heterosídico, a 3-rhamnosil-rhamnetina (CLARKE-LEWIS & DAINIS, 1968).

Em *Acacia farnesiana* THIEME & KHOGALI (1974), isolaram das folhas um flavonóide glicosilado, a 6-8- $\beta$ -C-glucosil-apigenina. Em *Acacia farnesiana* foram isolados também outros exemplares flavonoídicos localizados em suas folhas, a diosmetina e a farnesina (SAHU *et al.*, 1998) e em suas vagens, a naringenina, a quercetina, a miricetina e o campferol (BARAKAT *et al.*, 1999).

Em *Acacia confusa*, encontrada no norte de Taiwan, flavonóides galoilglucosídicos foram detectados por LEE *et al.* (2000) suas estruturas foram determinadas como miricetina-3-O-(2<sup>o</sup>-O-galoil)- $\alpha$ -rhamnopiranosídeo-7-metil-éter; miricetina-3-O-(3<sup>o</sup>-O-galoil)- $\alpha$ -rhamnopiranosídeo-7-metil-éter e miricetina-3-O-(2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>-di-O-galoil)- $\alpha$ -rhamnopiranosídeo.

Nas folhas de *Acacia mearnsii* foi detectada a mearnisitrina (MACKENZIE, 1967), além da presença de 3-metoxi-fisetina nesta espécie (DREWES & ISLEY, 1968).

As flores de *Acacia retinoides* apresentaram a 6-C-glucosil-naringenina (LORENTE *et al.*, 1982).

Do exudato de *Acacia neovernicosa*, foram isolados o 3-O-metil-campferol, a 3,3-dimetil-quercetina, a 2',4'- diidroxí-chalcona, a 2'-O-metil-4-hidroxí-chalcona, e a 3-O-metil-2',4'-dihidroxí-chalcona (WOLLEN-WEBER & SEIGLER, 1982).

Em *Acacia nigrenses*, dois flavonóis metilados a 7,8,3',4'-tetrahidroxí-3-metoxiflavona e 7,8,4'-trihidroxí-3,3'-dimetoxiflavona foram isolados por MALAN (1993).

Das flores frescas de *Acacia latifolia* foram isoladas a 7-O- $\beta$ -D-glucosil-quercetina, 3-O- $\beta$ -D-galactosil-quercetina, 3-O-triosil-quercetina, 3-O- $\beta$ -D-galactosil-miricetina, 3-O- $\beta$ -D-glucosil-miricetina, 7-O- $\alpha$ -D-glucosil-taxifolina, sendo a 7-glucosil-quercetina a flavanona majoritária (VOIRIN *et al.*, 1986). Outros glicosídeos

flavonólicos, a 3-O-rutinosil-iso-rhamnetina, 3-O-rutinosil-quercetina, 3-O-gentibiosil-quercetina, 3-O-glucosil-galactosil-quercetina, 3-O-glucosil-quercetina e 3-O-galactosil-quercetina também foram identificados nas folhas de *Acacia raddiana* (EL-MOUSALLAMY *et al.*, 1991).

Na classe das leucoentocianidinas uma leuco-robinetinidina monomérica, a leuco-fisetina (ROUX & EVELYN, 1958), (+)-fustina e fisetina (ROUX & PAULUS, 1960) foram obtidas do extrato das cascas e cerne de *Acacia mollissima*, respectivamente. Teracacidina, em especial foi encontrada em *Acacia intertexta* (CLARKE-LEWIS *et al.*, 1961). Em *Acacia caffra* foi isolado um análogo da teracacidina, o dímero, proteracacidina (MALAN, 1995), também as proteracacidinas (2S)-7,8,4'-trihidroxi-flavan-epioritin-4- $\alpha$ -ol-dimérico (MALAN *et al.*, 1997) e epioritina-(4-b-(r)-3)-epioritina-4- $\beta$ -ol e epimiquistol-(4-b-(r)-3)-epioritina-4- $\beta$ -ol (BENNIE *et al.*, 2000).

Proteracacidinas diméricas, também foram encontradas no cerne de *Acacia galpinii* (MALAN & SIREEPARSAD, 1995; COETZEE *et al.*, 1998).

No grupo das leucoantocianidinas também encontram-se o 8-O-metil e o 3-O-metil-flavan-3,4-diol isolados em *Acacia auriculiformis* (DREWES & ROUX, 1966), sendo ainda isolados em *Acacia cultriformis* (DU PREEZ & ROUX, 1970) e em *Acacia saxatilis* por FOURIER *et al.* (1974).

KIRILLOVA & KONDZHARIYA (1987) estudando a distribuição de taninos condensados em algumas espécies subtropicais de plantas, evidenciou a presença de uma cianidina, delfinidina e epicatequina em *Acacia dealbata*.

### 3.2.5 Algumas atividades biológicas encontradas em espécies de *Acacia*

Estudos sobre a química de *Acacia* levaram a investigações farmacológicas que revelaram interessantes atividades. O estudo dos extratos de algumas espécies de acácias Sudanesas, verificou que algumas destas, em especial a *Acacia albida* e a *Acacia seyal* promoveram o controle da esquistossomose transmitida pelo caramujo *Bulinus truncatus* e *Biomphalaria pfeifferi* agindo como molusquicidas (AYOUB & YANKOV, 1987). Nos extratos de *Acacia concina*, HYALIJ (1999) também constatou atividades molusquicidas e cercaricidas. Potente atividade

molusquicida também foi encontrada no extrato etanólico de *Acacia saligna* contra o caramujo *Biomphalaria alexandrina* (AHMED *et al.*, 1999).

WASSEL *et al.* (1992), estudando a presença de diversos constituintes químicos em *Acacia nilotica* e *Acacia farnesiana* puderam revelar que seus extratos etanólicos possuíam extraordinária atividade hipoglicêmica.

O extrato de *Acacia nilotica* revelou-se tóxica contra cercarias e miracídeos de *Schistosoma mansoni* (ELSHEIKH *et al.*, 1990), atividades antipiréticas e anti-inflamatórias (DAFALLAHS *et al.*, 1996), anti-PAF (atividade inibidora do fator de agregação plaquetária) (SHAH *et al.*, 1997); antifúngica, atribuída a presença dos polifenóis (BHARGAVA *et al.*, 1998); antifúngicas contra *Candida albicans* (extrato n-hexano) (MUSTAFA *et al.*, 1999), anti-hipertensiva, antiespasmódica (GILANI *et al.*, 1999), antiplasmódica *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (EL-TAHIR *et al.*, 1999) e um considerável efeito anti HIV-1, agindo sobre a replicação viral (HUSSEIN *et al.*, 1999).

*Acacia rehmanniana* mostrou atividade anti-inflamatória por inibição da ciclooxigenase (McGRAW *et al.*, 1997).

Os acaciasídeos, saponinas triterpenoidais, presentes no extrato metanólico de *Acacia auriculiformis* apresentaram atividades cestocida (GHOSH *et al.*, 1996), anti-helmínticas (BABU *et al.*, 1997) e anti-microfilariaêmicos contra *Setaria cervi* (SARKAR *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 1993).

Um estudo de *bioscreening* para detectar a atividade citotóxica contra células tumorais humanas evidenciou que *Acacia pennatula* exibiu importante atividade com diminuição das células tumorais testadas em cultura (POPOCCA *et al.*, 1998).

O extrato de *Acacia catechu* demonstrou ser um potente hepatoprotetor (JAYASEKHAR *et al.*, 1997).

HOFFMANN *et al.* (1993) avaliando o extrato orgânico de algumas espécies vegetais norte-americanas comprovaram o grande espectro de atividade de *Acacia angustifolia* por inibir completamente o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*.

Alta atividade antibacteriana demonstrou o extrato de *Acacia koa* contra *Pseudomonas aeruginosa* (BUSHNELL *et al.*, 1950) e *Acacia robusta* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (KHAN *et al.*, 1980).

ALI *et al.* (2001), estudando os extratos hexânicos e metanólicos de *Acacia nilotica* (L.) Delile e *Acacia senegal* (L.) Willd., em testes de atividades antibacterianas e antifúngicas, verificaram que no extrato hexânico de *A. nilotica* foi detectada uma atividade de 50% de inibição sobre a cepa de *E.coli* e no extratos metanólicos de *A. nilotica* e *A. senegal* foram detectadas cerca de 90% e 72% de inibição sobre o crescimento de *E.coli*, respectivamente; estas espécies ainda apresentaram cerca de 94% em *A. nilotica* e 80% em *A. senegal*, de inibição sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Atividades amebicidas foram encontradas em *Acacia arabica*, a qual mostrou-se efetiva contra o crescimento de *Entamoeba histolytica* em 50 % das amebiasis intestinais provocadas em cobaias (CHAKRABORTY & DAS, 1989).

Outras espécies de *Acacia* tem sido relatadas na medicina tradicional, sendo encontradas as mais diversas atividades biológicas *Acacia mellifera* e *A. kirkii* utilizadas no tratamento do câncer, *A. pentagona* utilizada na amenorréia, *A. polyantha* utilizada em crises asmáticas, *A. robusta* cuja raiz é utilizada no tratamento da esquistossomose (CHHABRA *et al.*, 1990).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

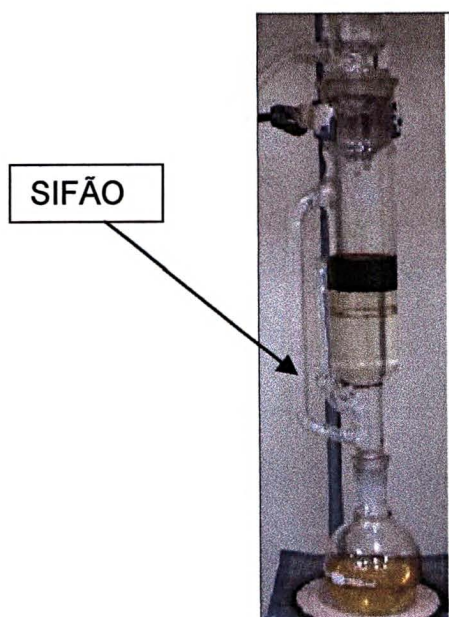
Flores de *Acacia longifolia* foram colhidas no Campus do Setor de Saúde – Subsede da UFPR, situada no Jardim Botânico em Curitiba (PR). Estas foram identificadas pelo botânico Gert Hatchbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba. Uma amostra autêntica do material foi herbarisada nesta instituição sob número de registro 261.856.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

O material vegetal foi seco e estabilizado em estufa à 40 °C, obtendo-se o que se denomina de droga. Para o preparo do extrato bruto hidroalcoólico, 192,5 g da droga levemente triturada foram submetidos a uma extração por refluxo com etanol. Foram 5 extrações de aproximadamente 20 minutos em ebulição. Os extratos etanólicos foram filtrados em papel filtro, reunidos e reduzidos em evaporador rotatório a vácuo até um volume de cerca de 200 ml, o qual foi deixado em geladeira ( $\pm 5$  °C) por 24h (overnight), para precipitar. Logo em seguida esse material foi centrifugado e o resíduo foi desprezado. Ao material restante foi adicionado água até completar o volume de 600 ml.

O extrato hidroalcoólico foi fracionado exaustivamente com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) em extrator sohxlet modificado para extração líquido-líquido (figura 5), no qual o sifão possui um alargamento em sua base evitando sifonamento do extrato e permitindo uma extração contínua, obtendo-se a fração denominada **F1**.

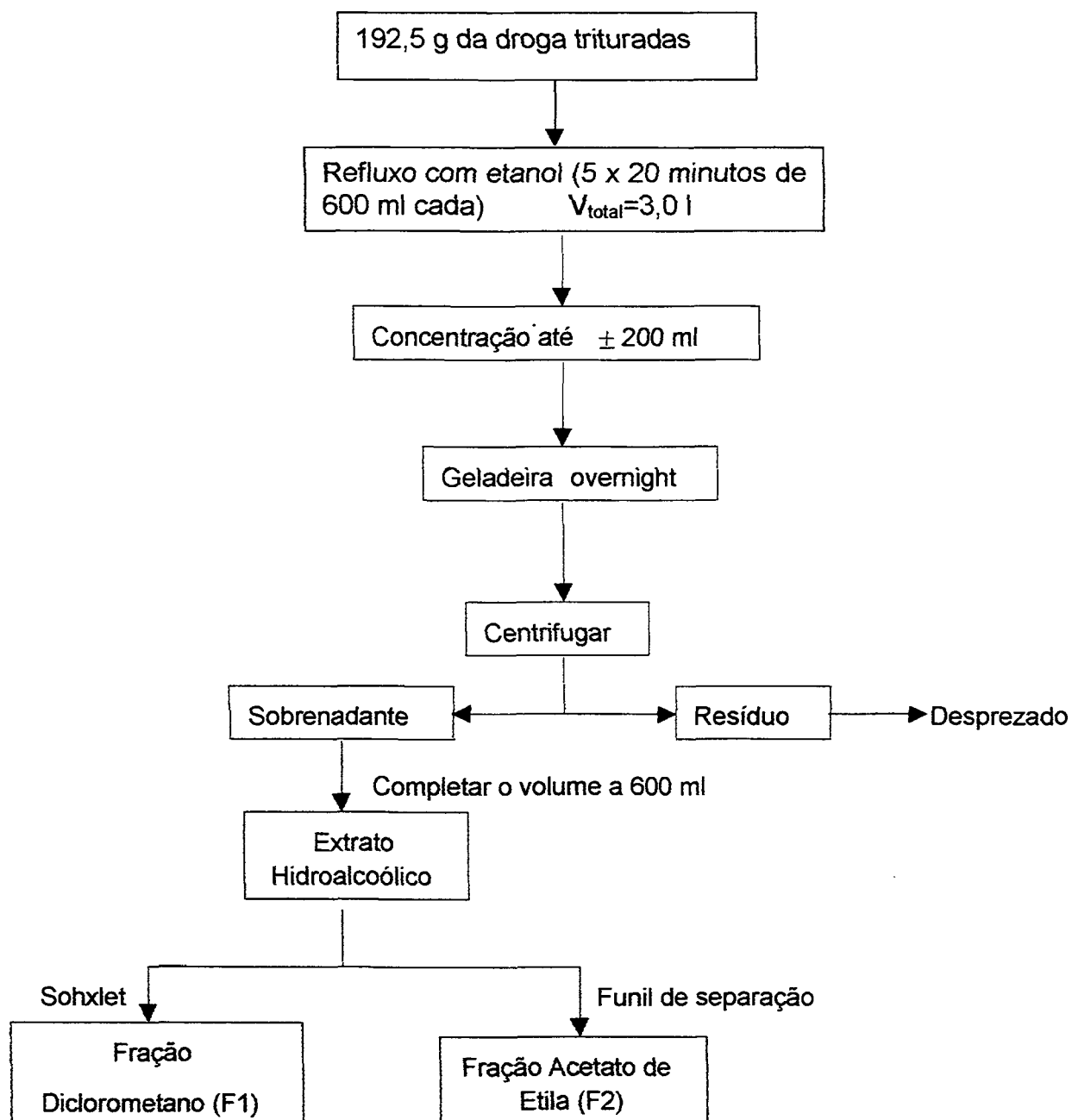
FIGURA 5 - SOHXLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.



O extrato hidroalcoólico remanescente foi fracionado exaustivamente com acetado de etila em funil de separação obtendo-se a fração denominada **F2**.

Destas frações e do extrato hidroalcoólico foram retiradas e reservadas alíquotas de aproximadamente 20 ml para realização de ensaios posteriores.

## ESQUEMA 2 - FLUXOGRAMA DE PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES.



## 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES (MASSA ABSOLUTA)

Uma alíquota de 5 ml de cada uma das frações e do extrato foram volumetricamente medidos, e levados à secar em estufa a 105 °C em placa de

petri previamente tarada por 1h também em estufa à mesma temperatura. O teor de sólidos (massa absoluta) foi calculado em relação a quantidade de material vegetal utilizada, ou seja, 192,5 g da droga.

#### 4.4 PROCESSAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

##### 4.4.1 Isolamento das substâncias contidas nesta fração

A fração acetato de etila restante foi reduzida em evaporador rotatório à vácuo até consistência xaroposa e sob chapa de aquecimento foi incorporada a pequenas porções de sílica gel 60 ( 0,063 a 0,200 mm) Merck (cerca de duas vezes o seu peso seco) para formação da pastilha de sílica. Posteriormente esta foi submetida à uma cromatografia em coluna (30 x 3 cm) empacotada com 30 g silicagel 60 ( 0,063 a 0,200 mm) Merck. O eluente inicial foi acetato de etila:ácido fórmico:água (98:1:1), sendo feito um gradiente com ácido fórmico e água até a proporção (90:5:5). O controle da eluição foi realizado com lâmpada de ultra violeta à 360 nm. Foram colhidas 62 frações de aproximadamente 10 ml cada.

Da fração 22 a 54 houve à cristalização de cerca de 143 mg de uma substância a qual foi re-submetida à cromatografia em coluna (CLV), utilizando-se funil com fundo de vidro sinterizado (G3), 10 g de sílica H Merck como suporte, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5) como eluente e vácuo para aumentar a rapidez do processo. Foram colhidas 24 frações de aproximadamente 10 ml cada. Da fração 3 a 17 houve a cristalização de 100 mg de uma substância pura amorfa denominada **AL1**.

As frações obtidas na primeira coluna foram analisadas por CCD (cromatofolha silicagel 60F<sub>254</sub> Merck, utilizando-se como fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5), a detecção foi feita em lâmpada de ultra violeta a 360 nm), tendo sido reunidas em 5 grandes frações:

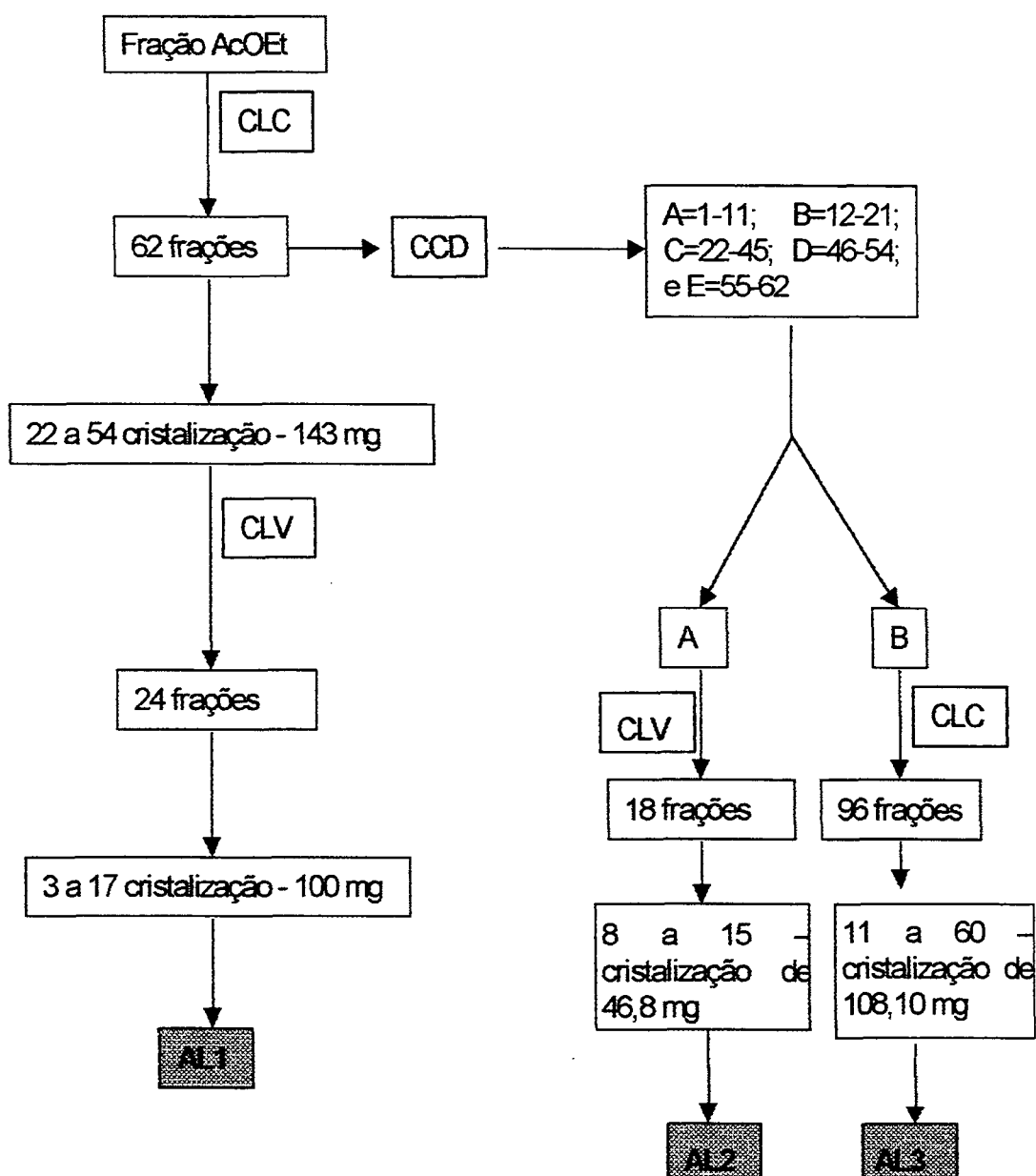
**A= 1-11      B=12-21      C= 22-45      D=46-54      E=55-62**

A fração A foi reduzida em evaporador rotatório à vácuo até consistência xaroposa e sob chapa de aquecimento foi incorporada a pequenas porções de sílica gel 60 ( 0,063 a 0,200 mm) Merck (cerca de suas vezes o seu peso seco) para formação da pastilha de sílica, a qual foi submetida ao mesmo tipo de coluna (CLV)

utilizado para purificar a substância **AL1**, utilizando-se acetato de etila:ácido fórmico:água (95:3:2) como eluente. Foram colhidas 18 frações de 10 ml cada. Nas frações de 8 a 15 ocorreu à cristalização de uma substância pura a qual após filtragem em funil com fundo de vidro sinterizado (G4) forneceu 46,8 mg de uma segunda substância denominada **AL2**.

A fração B foi reduzida em evaporador rotatório à vácuo até consistência xaroposa e sob chapa de aquecimento foi incorporada a pequenas porções de sílica gel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck para formação da pastilha a qual foi submetida a uma coluna (30 x 1 cm) preenchida com 30 g de sílicagel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck tendo como eluente inicial clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (94:5:1) aumentando o gradiente de acetato de etila até a proporção (59:40:1). O controle da eluição foi realizado com lâmpada de ultra violeta à 360 nm. Foram colhidas 96 frações de aproximadamente 10 ml cada. Das frações 11 a 60 foram obtidos 108,10 mg de um pó levemente amarelado amorfo puro denominado **AL3**.

### ESQUEMA 3 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS FLAVONÓIDES.



## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

### 4.5.1 Ponto de fusão

Realizado em microscópio de ponto de fusão do tipo Köepler.

#### 4.5.2 Espectroscopia de absorção no ultra violeta

As substâncias isoladas foram submetidas à varredura na região do ultravioleta próximo. Os espectros foram registrados em espectrofotômetro UV/visível UV 1601PC Spectrophotometer Shimadzu, no intervalo entre 200 e 400 nm.

As substâncias isoladas foram dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/100 ml. Cada série de espectros para cada uma das substâncias contém um em metanol (representando o espectro original da substância) e cinco obtidos pela adição de reagentes diagnósticos (NaOMe; NaOAc; NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; AlCl<sub>3</sub> e AlCl<sub>3</sub>/HCl) de acordo com MABRY *et al.* (1970).

Os espectros de absorção de luz na região do UV foram interpretados segundo MABRY *et al.* (1970).

#### 4.5.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H

Realizado em equipamento Varian, frequência de 300 MHz para <sup>1</sup>H. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm. Metanol deuterado foi usado como solvente. As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram fornecidas em Hz (hertz). Foi utilizada a abreviação *dd* para indicar um duplo dubleto.

#### 4.5.4 Espectroscopia de massa

Os espectros de massa das substâncias isoladas foram realizados em equipamento Finnigan MAT 900, equipado com uma interface de spray eletrônico (ESI). Os espectros foram coletados por constante infusão das amostras dissolvidas em metanol/água com 1% de ácido acético.

ESI é uma técnica de ionização suave, resultando em espécies protonadas, sodiadas, em modo de ionização positiva e desprotonadas, cloradas ou [M + ácido acético] em modo de ionização negativa.

#### 4.6 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As substâncias isoladas foram quantificadas em equipamento Merck-Hitachi (HPLC Manager System V.3 – Chromatography Data Station Software – com interface D-7000; detector PDA L-7450; Bomba L-7100; Desgaseificador de solvente L-7612; coluna RP18 Lichrospher<sup>®</sup> 100, Lichrocart<sup>®</sup> (250 x 4 mm – 5 µm)). Os cromatogramas foram registrados no intervalo de 209 a 503 nm. O fluxo da fase móvel foi de 0,7 ml/min em modo gradiente linear. O sistema de eluição é mostrado na tabela 1.

TABELA 1 - SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO EM CLAE ANALÍTICA

Tempo (min)	A	B	Fluxo (ml/min)
0,0	00	100	0,7
1,0	20	80	0,7
5,0	40	60	0,7
15,0	70	30	0,7
16,0	100	00	0,7
20,0	100	00	0,7
21,0	00	100	0,7
26,0	00	100	0,7

Observação: Gradiente linear. Frasco A - Metanol:Água (90:10), Frasco B - Água:Metanol (0:10). Foi adicionado 0,01 % (v/v) de ácido trifluoracético em ambos frascos.

Neste ensaio as amostras das substâncias isoladas (AL1, AL2 e AL3) e a fração acetato de etila foram diluídas em metanol nas seguintes concentrações:

- AL1= 0,097, 0,0485 e 0,02425 mg/ml,
- AL2 = 0,192, 0,128 e 0,064 mg/ml,
- AL3 = 0,08, 0,04 e 0,02 mg/ml,
- Fração acetato de etila = 1,45 mg/ml. Devido a baixa concentração relativa da substância AL3 encontrada, também foi realizada uma injeção com uma concentração de 5,8 mg/ml.

Foram injetados 20 µl por amostra e frações no sistema.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Este estudo foi desenvolvido para avaliar uma possível atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações obtidas nas etapas anteriores. Em algumas espécies de *Acacia*, estudos relataram atividades antimicrobianas, o que incentivou a investigação destas atividades com relação a espécie *Acacia longifolia*. Para tanto o extrato bruto etanólico e as frações acetato de etila e diclorometano foram testados frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, conhecidos por causar inúmeras doenças em seres humanos.

O estudo baseou-se na inoculação por difusão em gel segundo metodologia adaptada de SMÂNIA & DELLE MONACHE (1995), ULUBELEN *et al.* (2000) e ROMEIRO (2001); em condições totalmente assépticas em câmara de fluxo laminar, num meio de cultura específico, de uma solução padronizada dos microorganismos acima citados. Sobre este meio de cultura foram colocados discos de papel impregnados com soluções padronizadas das amostras a serem testadas e com um disco de cloranfenicol como controle positivo. Esse material então, foi incubado a 37 °C por 24h. O resultado positivo foi verificado através da formação de um halo inibitório de crescimento ao redor do disco impregnado.

- Preparo das amostras

As frações e o extrato empregados no estudo foram concentrados em evaporador rotatório à vácuo até à secura completa. Posteriormente estas frações foram padronizadas através de diluições utilizando-se como diluente o próprio solvente de cada fração testada, ou seja, fração acetato de etila diluída em acetato de etila e assim por diante. Foram utilizadas para o estudo as seguintes concentrações: 1.000 µg, 500 µg, 250 µg e 125 µg, calculados para o padrão de cloranfenicol (30 µg).

- Preparo dos discos de papel

Para cada concentração foram utilizados seis discos de papel de 6 mm de diâmetro (Newprov), num total de 72 discos. Estes discos foram colocados sobre uma placa de petri de 15 cm de diâmetro, devidamente identificados e cada um recebeu 20 µl de cada uma das amostras previamente preparadas. Os discos foram deixados em repouso até a total secura.

Foram também utilizados discos impregnados com os solventes utilizados, de modo a servirem como controle.

- Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o estudo foi o ágar Mueller-Hinton, por se tratar de um meio não enriquecido com nenhum nutriente, mas suficientemente nutritivo para um adequado desenvolvimento das colônias. Após o preparo, o meio foi autoclavado (120 °C por 15 minutos) e deixado esfriar a uma temperatura média de 50 °C. Nesta temperatura, 60 ml do meio de cultura foram adicionados em placas de petri de 15 cm de diâmetro, as quais após o meio solidificado foram fechadas e reservadas para a inoculação das cepas.

- Preparo do inóculo

As cepas utilizadas para o estudo foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), as quais foram repicadas em ágar Mueller-Hinton em tubos de ensaio 24 horas antes do teste.

Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 ml de salina estéril. Desta suspensão, transferiu-se 1 ml para um tubo de ensaio a qual foi diluída com salina estéril até obter uma turgidez semelhante a escala McFarland, obtendo-se suspensões bacterianas com as características mostradas na tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Microrganismo testado	Absorbância da suspensão (580 nm)	Total de bactérias na suspensão (UFC/ml)
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0,17	$2,36 \times 10^6$
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,28	$2,05 \times 10^6$
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	0,21	$2,34 \times 10^6$

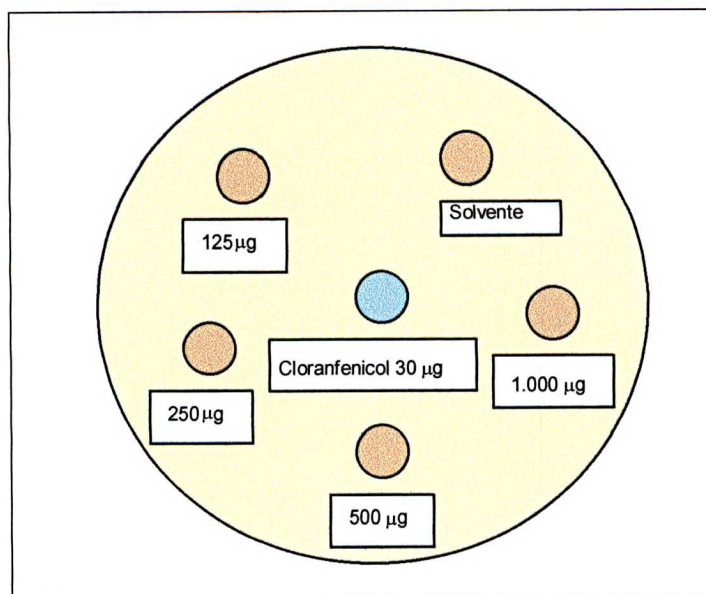
No momento da inoculação das placas, 1 ml desta suspensão padronizada foi adicionado a 100 ml de ágar Mueller-Hinton fundido, na temperatura de 45<sup>o</sup>C. Rapidamente, antes da solidificação, 10 ml deste meio foram transferidos para a superfície das placas de meio de cultura previamente preparadas, sob rápida homogeneização, de modo a obter uma fina camada do inóculo bacteriano. Desta forma foram preparadas 12 placas inoculadas com cada microorganismo, de modo que 10 delas foram utilizadas para o teste, enquanto duas foram utilizadas como controle positivo de crescimento.

- Preparo do teste

Para cada uma das frações testadas procedeu-se da seguinte maneira: em uma placa inoculada com *S. aureus* foram distribuídos seis discos de papel impregnados com 1.000 µg, 500 µg, 250 µg e 125 µg das frações e do extrato bruto, além de um disco impregnado apenas com o solvente e um disco de cloranfenicol (Newprov) (30 µg) como controle positivo, formando um círculo com espaço de 1,5 cm da borda da placa e 1,5 cm de um disco para outro. Em outras duas placas, inoculadas com *S. epidermidis* e *E. coli*, procedeu-se da mesma maneira (Figura 5).

O teste foi realizado em triplicata, e as placas prontas foram incubadas em estufa à 35<sup>o</sup>C durante 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa e foram medidos os halos de inibição, quando presentes.

FIGURA 6 - DISPOSIÇÃO DOS DISCOS NA PREPARAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.



#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Este estudo foi desenvolvido para avaliar uma possível atividade antifúngica da fração acetato de etila obtida nas etapas anteriores. Em algumas espécies de *Acacia*, estudos relataram atividades antifúngicas determinadas pela presença dos polifenóis, incentivando a investigação destas atividades com relação a espécie *Acacia longifolia*. Para a fração acetato de etila foi testada frente aos isolados dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* (obtido de raízes de café), *Cylindrocladium spathulatum* (obtido de folhas de erva-mate), *Rhizoctonia* sp. (obtido de plântulas de *Pinus taeda*) e *Colletotrichum acutatum* (obtido dos frutos do morangueiro).

O estudo baseou-se na avaliação crescimento micelial segundo metodologia adaptada de AUER & BETTIOL (1986) e STANGARLIN *et al.* (1999), em condições totalmente assépticas em câmara de fluxo laminar, num meio de cultura específico, com a inoculação dos esporos dos fitopatógenos acima citados. Esse material então, foi incubado a 25 °C no escuro até o momento em que as colônias fúngicas do controle atingissem aproximadamente a superfície total do meio de cultura. As

avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), das colônias-controle e das colônias-teste. O resultado positivo foi verificado através da formação de um halo inibitório de crescimento micelial dos patógenos sob o meio de cultura incorporado à fração testada.

- Preparo da amostra

A fração acetato de etila empregada foi levada à secura até a obtenção de uma consistência pastosa. Desta fração, foi retirada uma alíquota de 250 mg a qual foi diluída em 500 ml água destilada, obtendo-se assim uma diluição de 500 ppm.

- Preparo do meio de cultura

A fração acetato de etila foi incorporada em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e o conjunto foi autoclavado a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar este meio incorporado foi vertido em placas de petri de 15 cm de diâmetro. Cerca de 48 horas de pausa foram necessárias para avaliar uma suposta contaminação do meio antes da inoculação dos patógenos.

- Preparo do inóculo

O inóculo empregado foram discos de micélio-ágar, retirados de colônias puras de *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium spathulatum*, *Rhizoctonia* sp. e *Colletotrichum acutatum*, com 18, 21, 6 e 30 dias de idade em BDA, respectivamente.

- Preparo do teste

Após o tempo de pausa de 48 horas, as placas de petri com o meio de cultura receberam discos de micélio de 5 mm de diâmetro dos patógenos testados (dispostos no centro da placa), vedadas com filme plástico e incubadas a 25 °C, no

escuro. Foram feitas seis repetições para cada patógeno testado e seis repetições para o controle contendo apenas meio BDA. As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), no momento em que as colônias fúngicas do tratamento controle atingissem aproximadamente a superfície total do meio de cultura.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES (MASSA ABSOLUTA)

A determinação do teor de sólidos do extrato bruto hidroalcoólico e das frações obtidas no fracionamento são mostradas na tabela 3. Verificou-se que a maior parte das substâncias a serem isoladas encontravam-se na fração acetato de etila.

TABELA 3 - TEOR DE SÓLIDOS ENCONTRADOS NO EXTRATO BRUTO E EM CADA UMA DAS FRAÇÕES

Fração	Massa (g)	Teor (%)
Hidroalcoólica (Extrato bruto)	14,18	7,37%
Diclorometano (F1)	3,08	1,60%
Acetato de etila (F2)	9,12	4,74%

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

#### 5.2.1 Caracterização da substância AL1

- Ponto de fusão

A amostra apresentou a ponto de fusão numa faixa de 172 a 173 °C.

- Espectroscopia de absorção de luz na região do ultra violeta

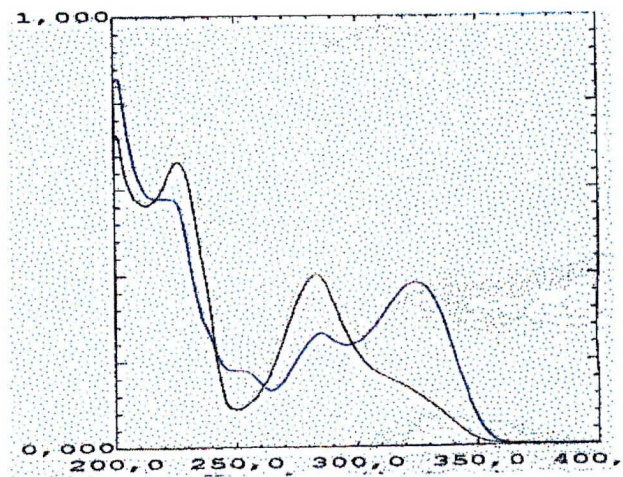
A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta em metanol indicou uma banda principal a 283 nm ( $\log \epsilon=4,24$ ) e um ombro a 320 nm ( $\log \epsilon=3,78$ ), zona de absorção característica para flavanonas (Figura 7). Ocorreu um

deslocamento batocrômico de 42 nm com a adição de metóxido de sódio a solução metanólica indicando a presença de grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A (Figura 7).

A solução metanólica em presença de acetato de sódio mostrou um deslocamento batocrômico da banda II de 43 nm, confirmando a presença de grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A (Figura 8). A adição de ácido bórico a solução contendo acetato de sódio levou o espectro a um retorno a condição original caracterizando a ausência de grupamentos orto-di-hidroxi e/ou C<sub>5</sub>-OH livres (Figura 8).

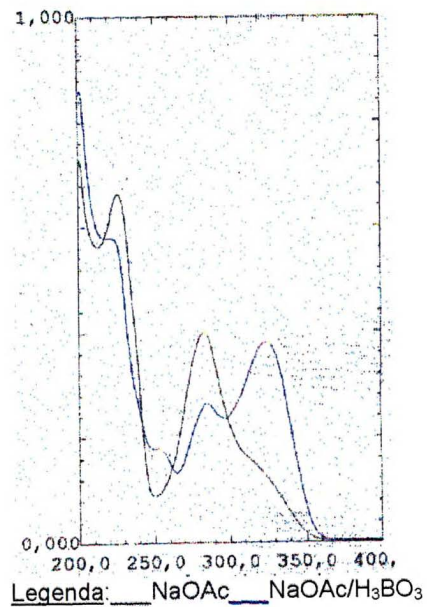
A ausência de deslocamento quando da adição de cloreto de alumínio a solução metanólica, e a permanência deste efeito, mesmo com a adição de ácido clorídrico ao sistema confirmando a ausência de grupamentos orto-di-hidroxi e/ou C<sub>5</sub>-OH livres (Figura 9).

FIGURA 7 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV PARA A SUBSTÂNCIA AL1.



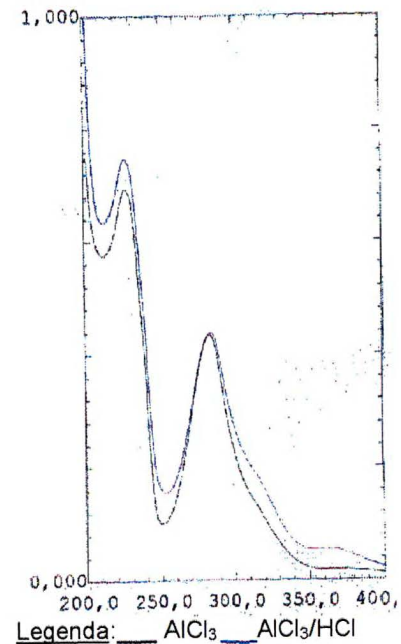
Legenda: \_\_\_ MeOH \_\_\_ NaOMe

FIGURA 8 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc E NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL1 EM MeOH.



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

FIGURA 9 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl<sub>3</sub> E AlCl<sub>3</sub>/HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL1 EM MeOH.



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

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$

A região aromática do espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 10) mostrou sinais característicos para anel aromático mono substituído, dubletos a 7,29 e 6,79 ppm, com  $J = 8,24$  Hz e  $J = 8,0$  Hz respectivamente com integração para dois hidrogênios cada, indicando um padrão de substituição *orto*. Além destes sinais ainda foram verificados os dubletos a 6,46 e 6,11 ppm com  $J = 2,0$  Hz e  $J = 2,0$  Hz respectivamente e integração para um hidrogênio cada, indicando um padrão de substituição *meta*. O *dd* a 5,31 ppm apresenta acoplamento de  $J = 2,7$  Hz com o *dd* a 2,69 ppm e de  $J = 12,2$  Hz com o *dd* a 2,98 ppm, sendo que os dois últimos sinais apresentam acoplamento entre si de  $J = 16,3$  Hz ( $\text{CH}_2$ ), caracterizando assim uma flavanona com substituinte em C5. De acordo com a correlação de Karplus (SILVERSTEIN *et al.*, 1991) a constante de acoplamento de  $J = 12,2$  Hz entre H2 e H3 $\beta$  corresponde a um ângulo de diedro de  $180^\circ$  e a constante de acoplamento de  $J = 2,7$  Hz entre H2 e H3 $\alpha$  corresponde a um ângulo de diedro de  $55^\circ$ . Estas correlações e o uso de modelos moleculares nos permitem indicar que o anel aromático mono substituído esta em posição  $\beta$  em relação ao plano do núcleo  $\gamma$ -pirona.

A presença do dubleto a 4,75 ppm (H1'') com  $J = 6,8$  Hz, o dubleto a 3,93 ppm (H6'' $\beta$ ) com  $J = 11,3$  Hz, o *dd* a 3,73 ppm (H6'' $\alpha$ ) com  $J = 11,3$  Hz e  $J = 4,5$  Hz e o congestionamento de sinais na região entre 3,31 ppm e 3,46 ppm indicam a presença de grupamentos açúcar.

- Espectroscopia de Massa

O espectro de massa da substância AL1 (Figura 11) foi estabelecida a partir da técnica de ionização suave de espectrometria de massas em modo íon positivo, apresentando o pico íon molecular de  $m/z$  457,1187  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , (434,1213 calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ ) indicando tratar-se de um heterosídeo da naringenina, flavanona previamente isolada neste vegetal.

TABELA 4 - DADOS DE RMN <sup>1</sup>H PARA A SUBSTÂNCIA AL1.

H-n <sup>o</sup>	M	δ (ppm)	J (Hz)[ H acoplado-n <sup>o</sup> ]
2	dd	5,31	2,7 [3α], 12,2 [3β]
3α	dd	2,69	2,7 [H2], 16,3 [3β]
3β	dd	2,98	12,2 [H2], 16,3 [3α]
6	d	6,11	2,0
8	d	6,46	2,0
2'	d	7,29	8,2
3'	d	6,79	8,0
5'	d	6,79	8,0
6'	d	7,29	8,2
1"	d	4,75	6,8
6"α	dd	3,73	11,3 [6"β], 4,5 [H5]
6"β	d	3,93	11,3

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H PARA A SUBSTÂNCIA AL1

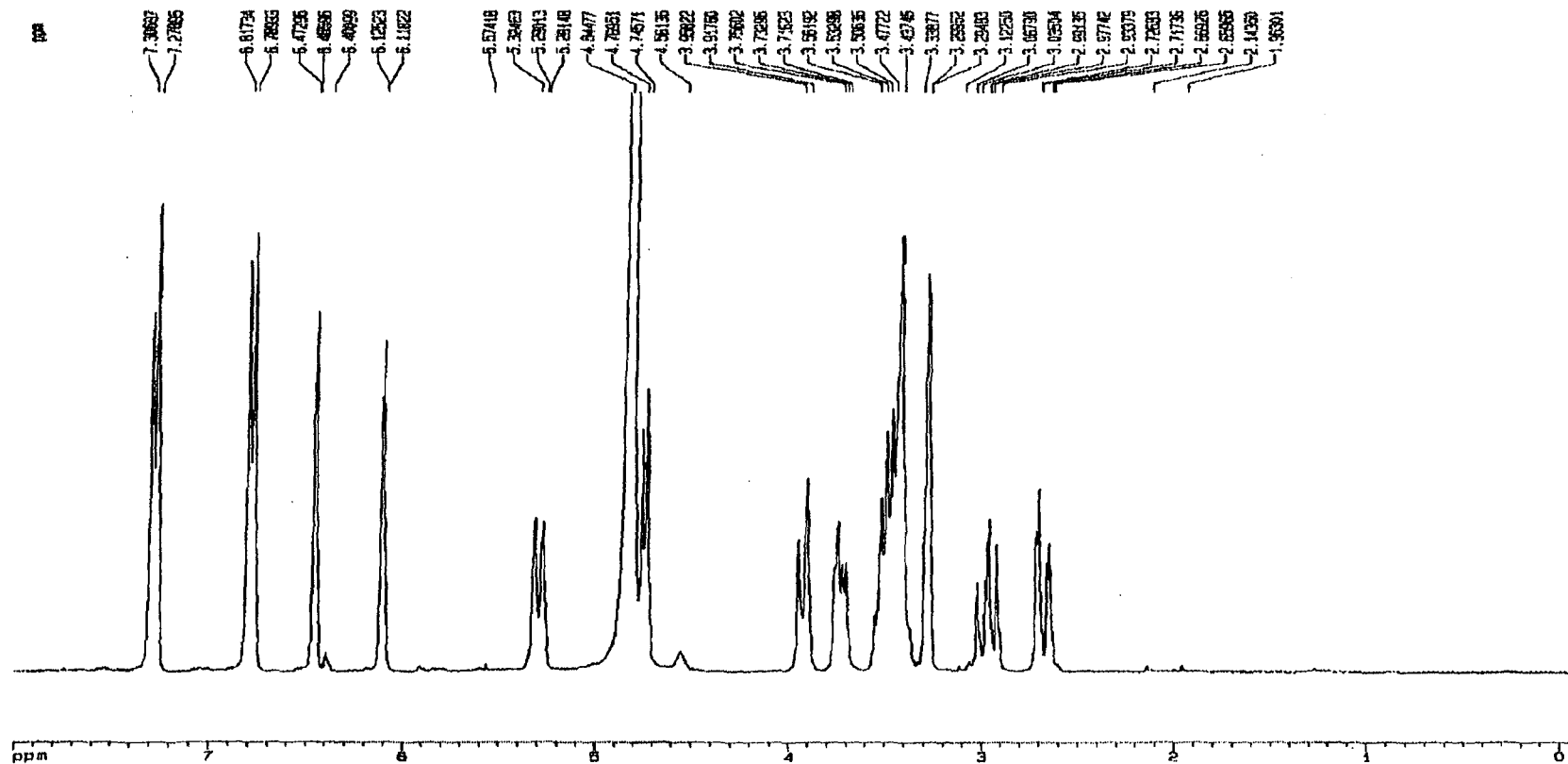
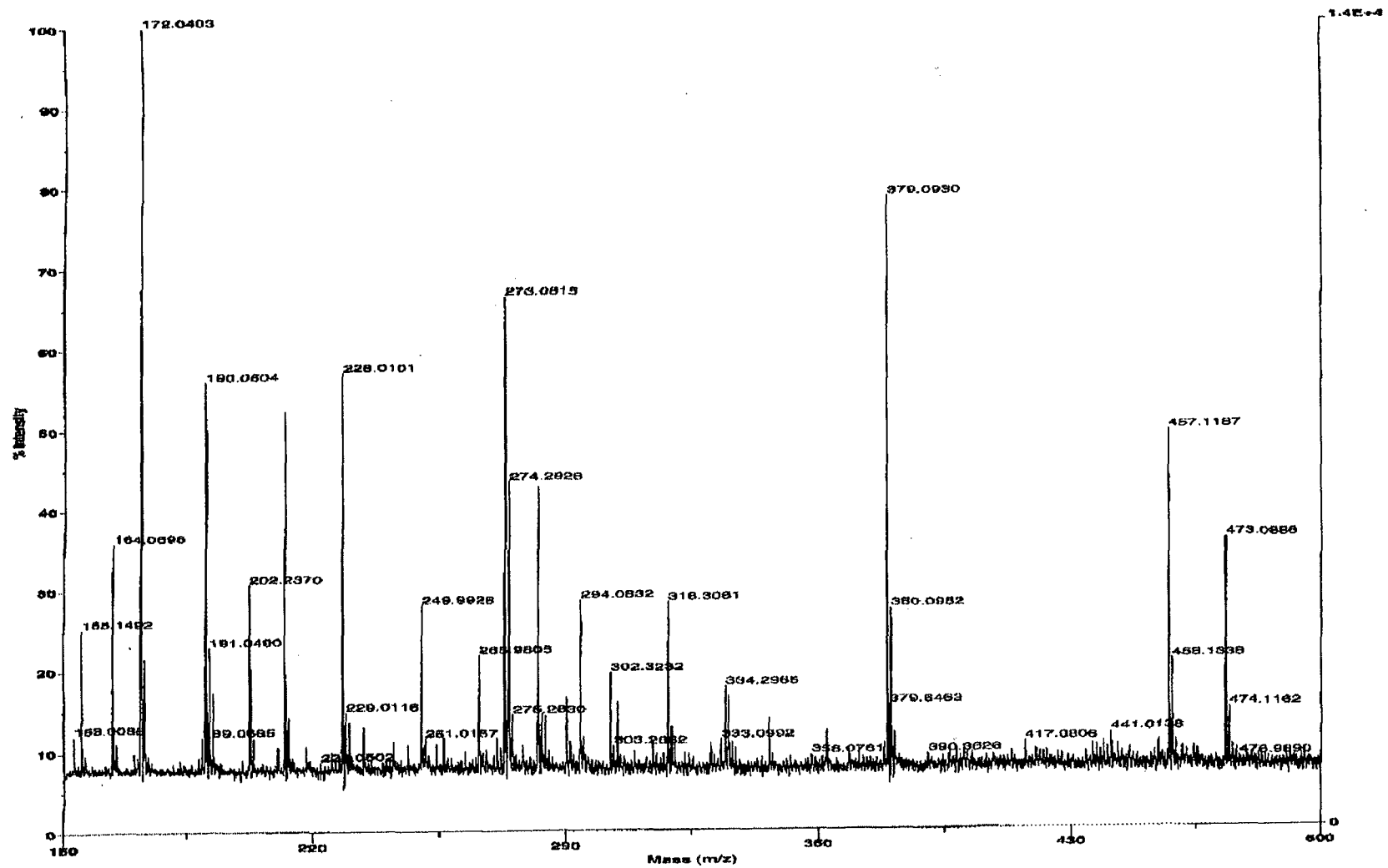


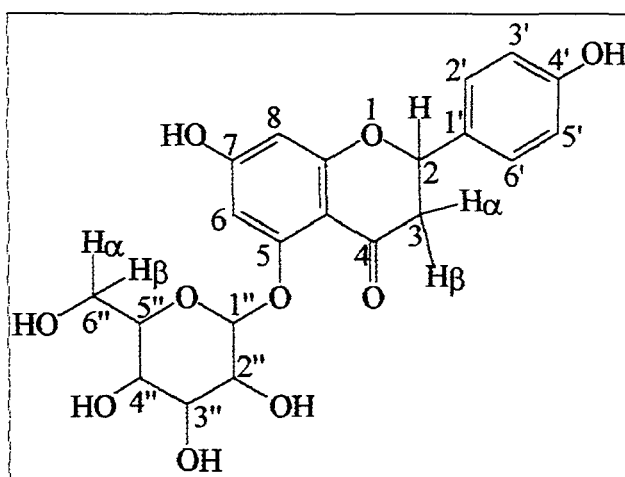
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSA PARA SUBSTÂNCIA AL1.



- Geral

O estudo do comportamento da substância AL1 no UV indicou a presença de uma flavanona com hidroxila livre em C7. A ressonância magnética nuclear protônica confirma a presença de uma flavanona, demonstra a presença de substituinte em C5, C7 e C4' e a presença de um grupamento açúcar, o que é confirmado pela massa molecular de 434 encontrada. O grupamento açúcar precisa estar ligado a molécula de naringenina através da hidroxila do C5, uma vez que não houve deslocamento da banda de absorção no UV pela adição de  $\text{AlCl}_3$ . A hidrólise do heterosídeo, seguida de cromatografia em camada delgada da genina e da parte osídica padrão confirma a presença da naringenina e determina a presença de galactose. Com base nestes dados podemos afirmar que a substância AL1 trata-se da 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenina (Figura 12), com ponto de fusão numa faixa de 172 a 173° C.

FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 5- $\beta$ -D-GALACTOSIL-NARINGENINA.



### 5.2.2 Caracterização da substância AL2

- Ponto de fusão

A amostra apresentou a ponto de fusão numa faixa de 236 a 238 °C.

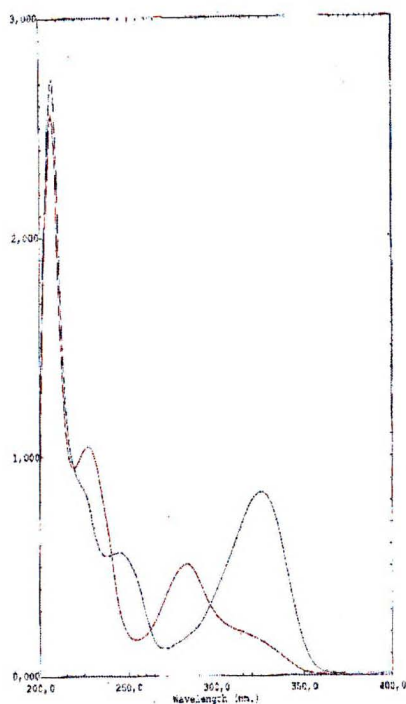
- Espectroscopia de absorção de luz na região do ultra violeta

A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta em metanol registrou uma banda principal a 282 nm ( $\log \epsilon=4,35$ ) e um ombro a 315 nm ( $\log \epsilon=3,98$ ), correspondendo a um pico de absorção típico para flavanonas (Figura 13). O deslocamento batocrômico de aproximadamente 40 nm causado pela adição de metóxido de sódio indica a presença de grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A (Figura 13).

Quando adicionado acetato de sódio a solução metanólica da substância AL2 ocorre um deslocamento batocrômico de 44 nm confirmando a presença de grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A (Figura 14). A adição de ácido bórico a solução contendo acetato de sódio levou o espectro a condição original caracterizando a ausência de grupamentos orto-di-hidroxi e/ou C<sub>5</sub>-OH livres (Figura 14).

Semelhante a substância AL1, a substância AL2 também mostra ausência de deslocamento quando da adição de cloreto de alumínio a solução metanólica, e a permanência deste efeito, mesmo com a adição de ácido clorídrico ao sistema confirmando a ausência de grupamentos orto-di-hidroxi e/ou C<sub>5</sub>-OH livres (Figura 15).

FIGURA 13 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV PARA A SUBSTÂNCIA AL2.



Legenda: — MeOH — NaOMe

FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc E NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL2 EM MeOH

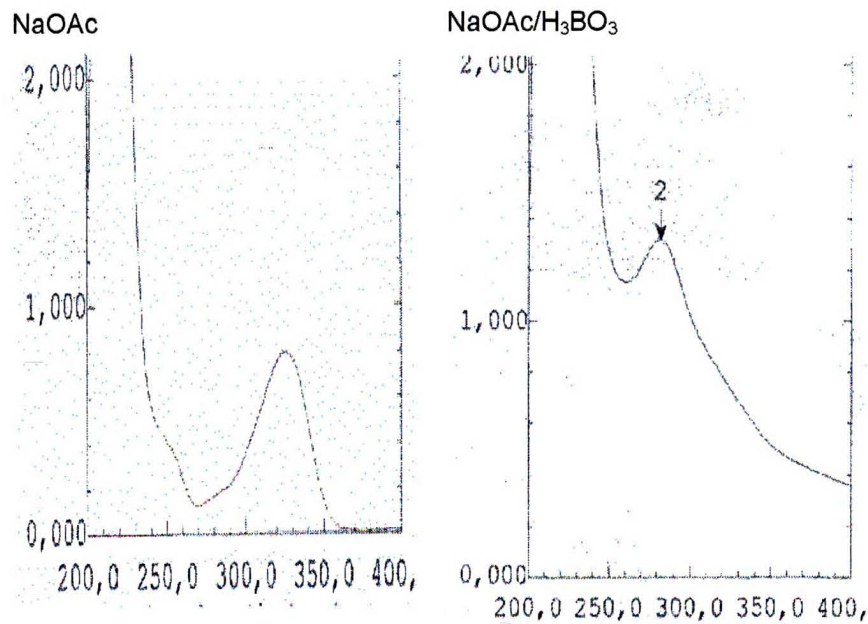
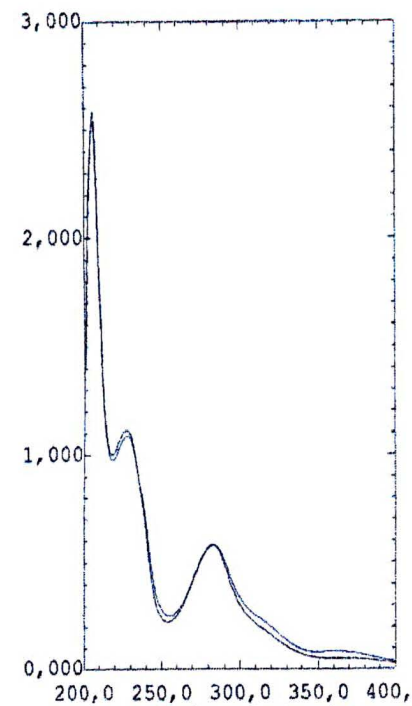


FIGURA 15 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl<sub>3</sub> E AlCl<sub>3</sub>/HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL2 EM MeOH.



- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$

A região aromática do espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 16) mostrou sinais característicos para anel aromático mono substituído (dubletos a 7,2 e 6,7 ppm, ambos com  $J = 8,24$  Hz – acoplamento *orto* – com integração para dois hidrogênios cada). Além destes sinais ainda foram verificados os dubletos a 6,38 e 6,04 ppm com  $J = 2,47$  Hz e integração para um hidrogênio cada, indicando um padrão de substituição *meta*. O *dd* a 5,22 ppm apresenta acoplamento de  $J = 2,6$  Hz com o *dd* a 2,62 ppm e de  $J = 12,9$  Hz com o *dd* a 2,88 ppm, sendo que os dois últimos sinais apresentam acoplamento entre si de  $J = 16,9$  Hz, caracterizando assim uma flavanona com substituinte em C5. De acordo com a correlação de Karplus a constante de acoplamento de  $J = 12,9$  Hz entre H2 e H3 $\beta$  corresponde a um ângulo de diedro de  $180^\circ$  com e a constante de acoplamento de  $J = 2,6$  Hz entre H2 e H3 $\alpha$ ; corresponde a um ângulo de diedro de  $55^\circ$ . Estas correlações e o uso de modelos moleculares nos permitem indicar que o anel aromático mono substituído esta em posição  $\alpha$  em relação ao plano do núcleo  $\gamma$ -pirona.

A presença do dubleto a 4,70 ppm (H1'') com  $J = 7,14$  Hz, o dubleto a 3,85 ppm (H6'' $\beta$ ) com  $J = 12,09$  Hz, o *dd* a 3,65 ppm (H6'' $\alpha$ ) com  $J = 12,09$  Hz e  $J = 4,94$  Hz e o congestionamento de sinais na região entre 3,4 ppm e 3,6 ppm indicam a presença de grupamentos açúcar.

- Espectroscopia de Massa

O espectro de massa da substância AL2 (Figura 17) foi estabelecida a partir da técnica de ionização suave de espectrometria de massas em modo íon positivo, apresentando o pico íon molecular de  $m/z$  457,1187  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , (434,1213 calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ ) indicando tratar-se de um heterosídeo da naringenina, flavanona previamente isolada neste vegetal.

TABELA 5 - DADOS DE RMN <sup>1</sup>H PARA A SUBSTÂNCIA AL2.

H-n <sup>o</sup>	M	δ (ppm)	J (Hz) [ H acoplado-n <sup>o</sup> ]
2	dd	5,22	2,6 [3α], 12,9 [3β]
3α	dd	2,62	2,6 [H2], 16,9 [3β]
3β	dd	2,88	12,9 [H2], 16,9 [3α]
6	d	6,04	2,47
8	d	6,38	2,47
2'	d	7,2	8,24
3'	d	6,7	8,24
5'	d	6,7	8,24
6'	d	7,2	8,24
1''	d	4,7	7,14
6 <sup>α</sup>	dd	3,85	12,09 [6 <sup>β</sup> ], 4,94 [H5]
6 <sup>β</sup>	d	3,65	12,09

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  PARA A SUBSTÂNCIA AL2.

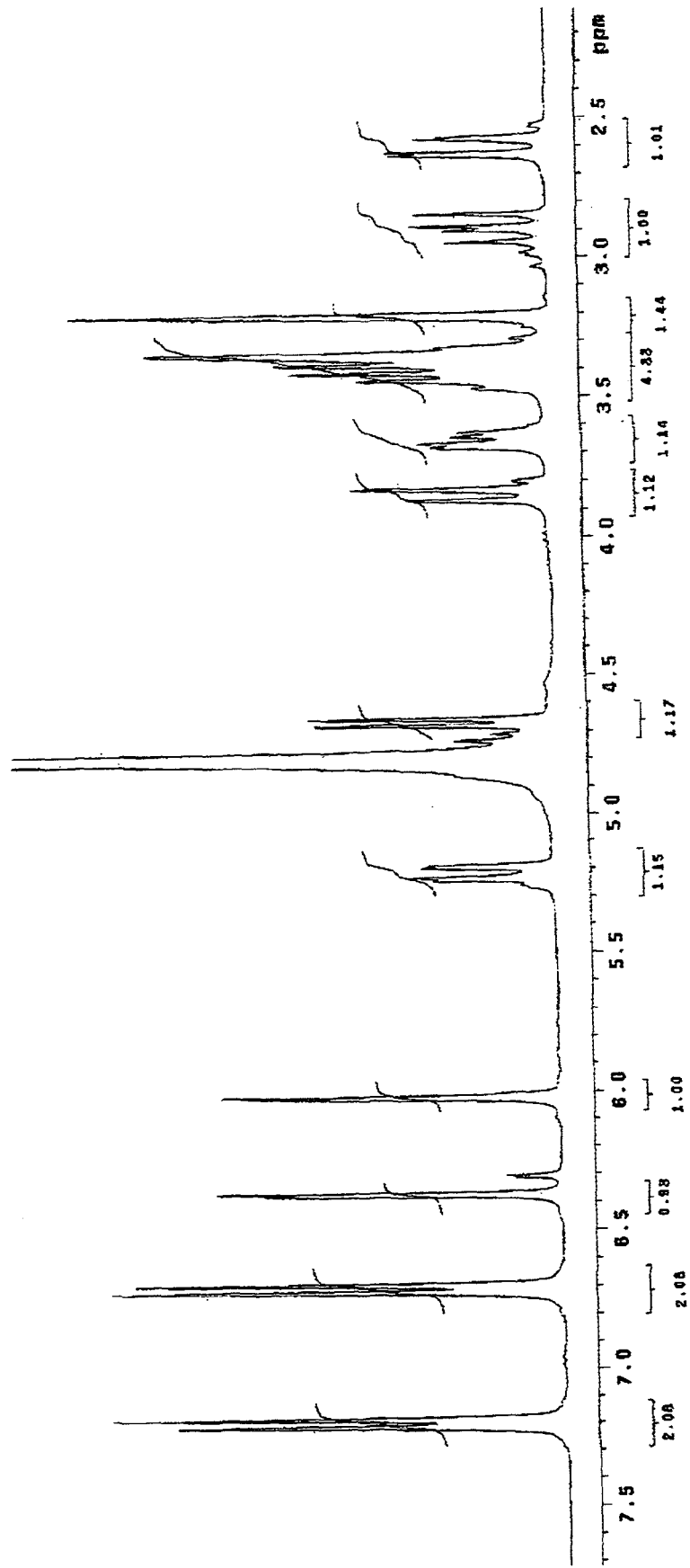
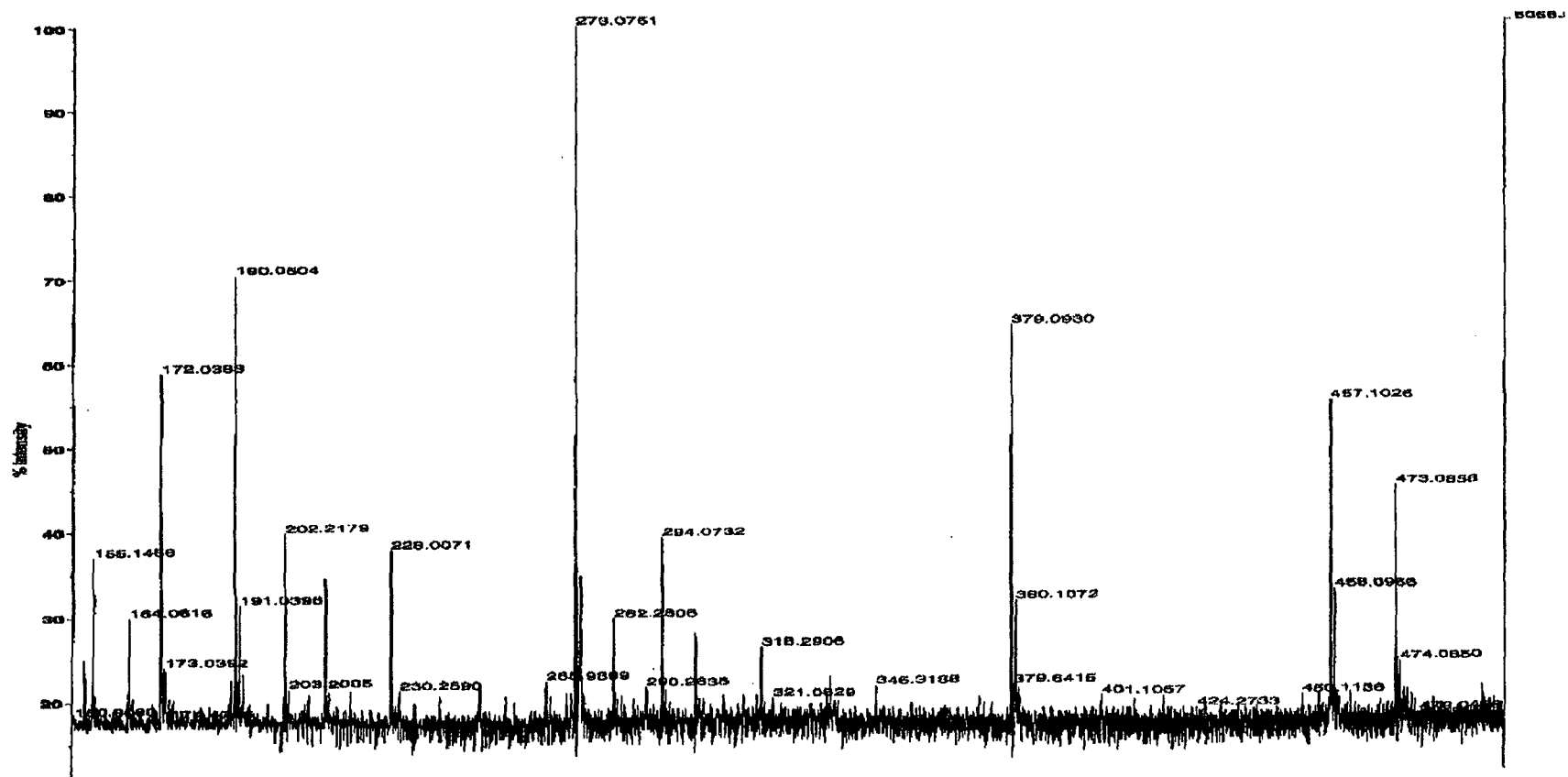


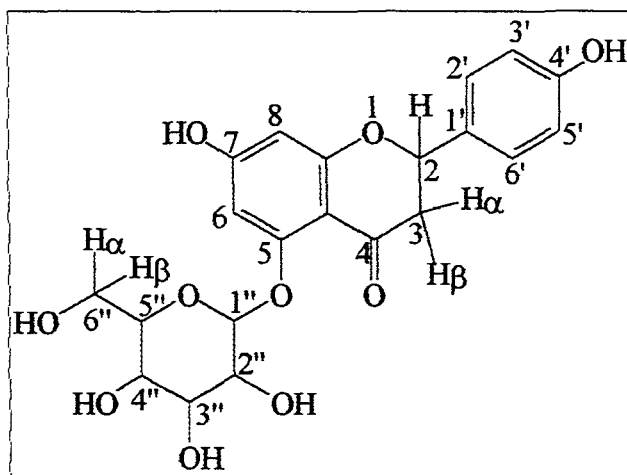
FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSA PARA A SUBSTÂNCIA AL2.



- Geral

O estudo do comportamento da substância AL2 no UV indicou a presença de uma flavanona com hidroxila livre em C7. A ressonância magnética nuclear protônica confirma a presença de uma flavanona, demonstra a presença de substituinte em C5, C7 e C4' e a presença novamente de um grupamento açúcar, o que é confirmado pela massa molecular de 434 encontrada. O grupamento açúcar precisa estar ligado a molécula de naringenina através da hidroxila do C5, uma vez que não houve deslocamento da banda de absorção no UV pela adição de  $AlCl_3$ . A hidrólise do heterosídeo, seguida de cromatografia em camada delgada da genina e da parte osídica confirma a presença da naringenina e determina a presença de glucose. Com base nestes dados podemos afirmar que a substância AL2 trata-se da 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenina (Figura 18), com ponto de fusão numa faixa de 236 a 238 °C (PEARL & DARLING, 1970; LORENTE *et al.*, 1982; KERBER, 1993), previamente identificada nesta planta por KERBER (1993).

FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA 5- $\beta$ -D-GLUCOSIL-NARINGENINA.



### 5.2.3 Caracterização da substância AL3

- Ponto de fusão

A amostra apresentou ponto de fusão numa faixa de 250 a 251 °C.

- Espectroscopia de absorção de luz na região do ultra violeta

A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta em metanol, mostrou uma banda principal a 288 nm ( $\log \epsilon=4,31$ ) e um ombro a 327 nm ( $\log \epsilon=3,74$ ), característico de flavanonas (Figura 19). O deslocamento batocrômico de 37 nm causado pela adição de metóxido de sódio indica a presença de grupamentos hidroxila livres nas posições 5 e 7 do anel A (Figura 19).

O deslocamento batocrômico de 37 nm causado pela adição de acetato de sódio confirma a presença de grupamentos hidroxila livres nas posições 5 e 7 do anel A (Figura 20). O retorno ao espectro original (em metanol) causado pela adição de ácido bórico sobre a solução contendo acetato de sódio indica a ausência de grupamentos orto-di-hidroxi livres no anel A (Figura 20).

O deslocamento batocrômico de 19 nm causado pela adição de cloreto de alumínio (Figura 21) e o não retorno ao espectro em metanol com a adição de ácido clorídrico ao sistema indica a presença de grupamento hidroxila livre no C<sub>5</sub> (Figura 21).

FIGURA 19 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ NA REGIÃO DO UV DA SUBSTÂNCIA AL<sub>3</sub>.

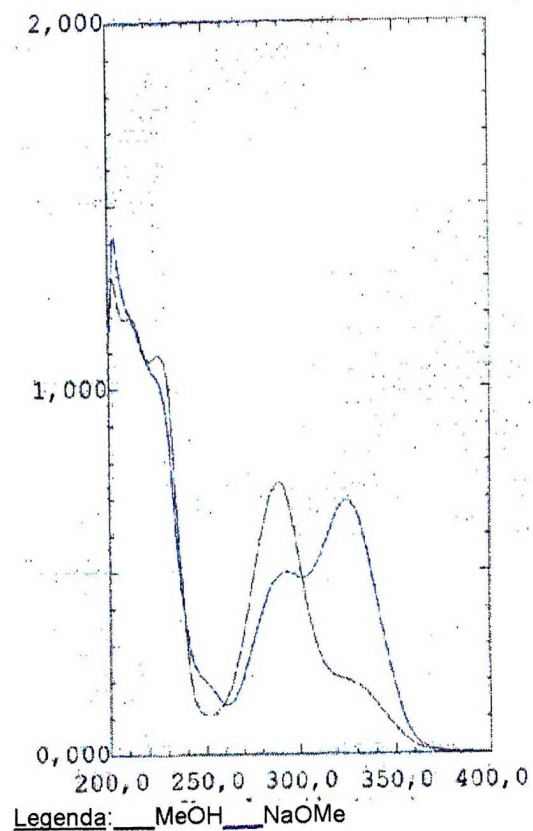


FIGURA 20 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaOAc E NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> SOBRE A SUBSTÂNCIA AL<sub>3</sub> EM MeOH.

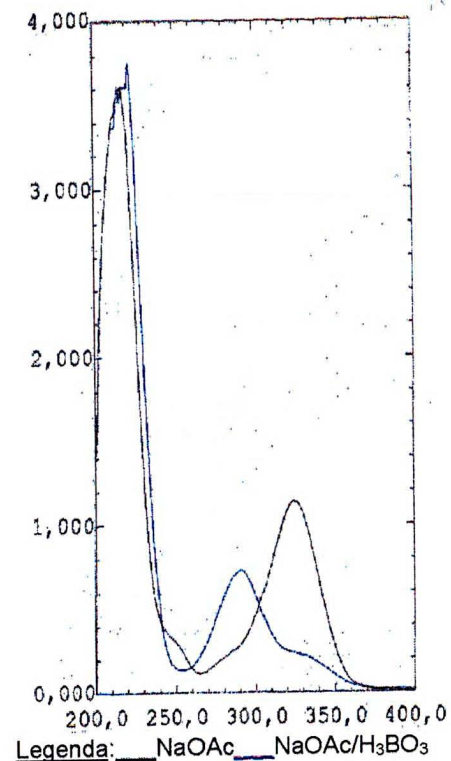
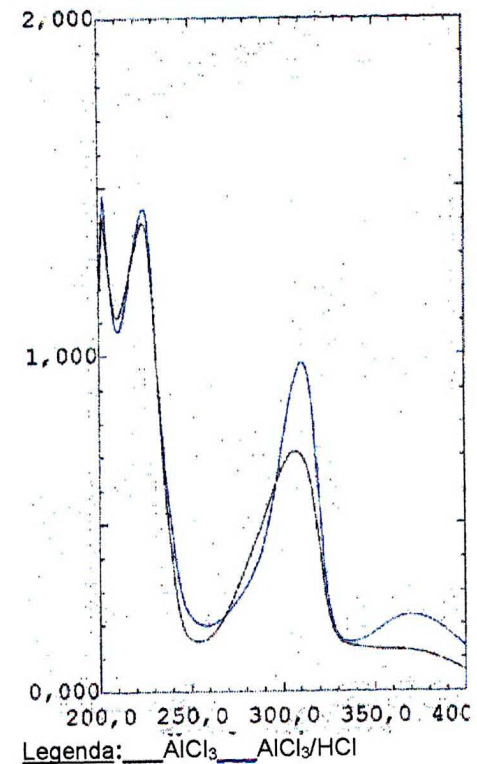


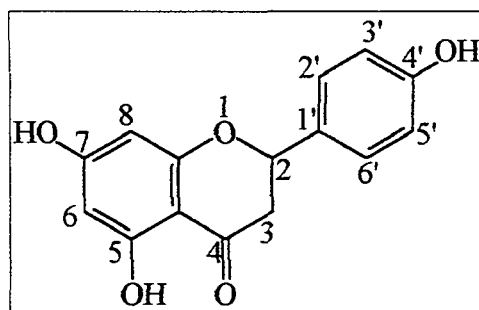
FIGURA 21 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AlCl<sub>3</sub> E AlCl<sub>3</sub>/HCl SOBRE A SUBSTÂNCIA AL<sub>3</sub> EM MeOH.



- Geral

A substância AL3 apresentou o mesmo ponto de fusão da naringenina ( $C_{15}H_{12}O_5$ ), numa faixa entre 250 a 251 °C, e da mesma forma a espectroscopia de UV. Já tendo sido anteriormente isolada nas flores deste vegetal por MARINI-BETTOLO & FALCO (1951) e por KERBER (1993), não se tornou necessário mais ensaios para demonstrar sua identidade (Figura 22).

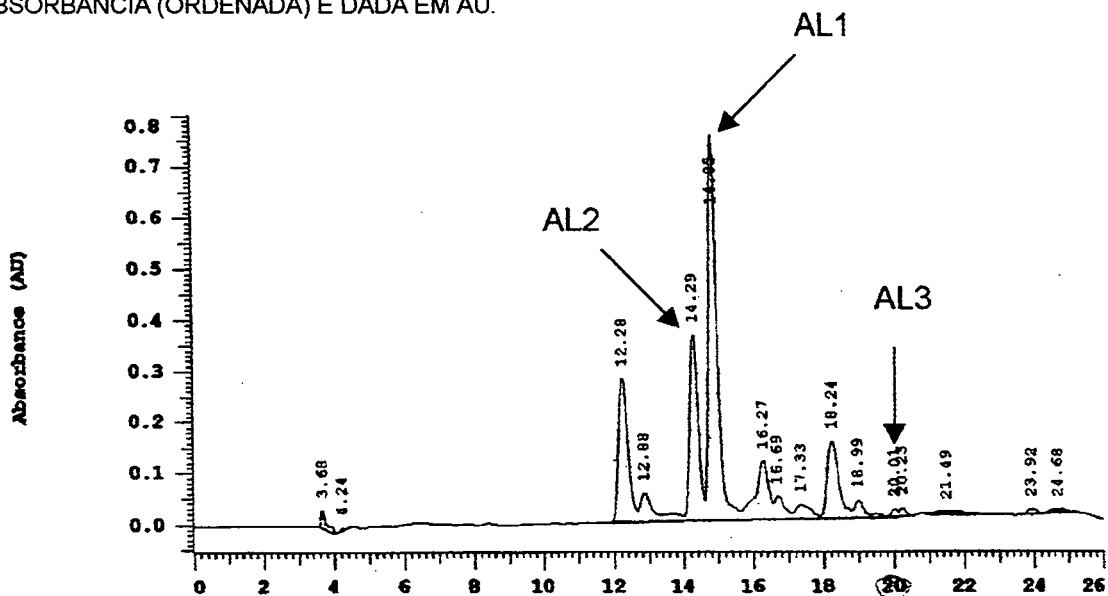
FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DA NARINGENINA.



### 5.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As três substâncias principais foram detectadas em tempos de retenção de 14,85 (AL1), 14,29 (AL2) e 20,01 (AL3) minutos no cromatograma do fração acetato de etila obtido por CLAE (Figura 23). As áreas dos picos das substâncias isoladas na fração acetato de etila são mostradas na tabela 9.

FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Acacia longifolia* POR CLAE (CONCENTRAÇÃO 1,45 mg/ml). OS TEMPOS DE RETENÇÃO (ABCISSA) SÃO DADOS EM MINUTOS. A ABSORBÂNCIA (ORDENADA) É DADA EM AU.



Foi determinada a linearidade de resposta às concentrações das amostras injetadas, a quantificação das mesmas nas frações estudadas foi realizada utilizando-se a equação da reta resultante do gráfico: Concentração (mg/ml) x Área dos picos integrados pelo sistema de análise do equipamento, mostrado nas tabelas (6, 7 e 8) e nos gráficos (Figuras 24, 25 e 26) permitindo calcular as concentrações das substâncias isoladas referentes aos picos encontrados na fração acetato de etila injetada (tabela 9).

TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20 $\mu$ l) DA SUBSTÂNCIA AL1

Concentração (mg/ml)	Área
0,097	2315107
0,0485	1152201
0,02425	821432

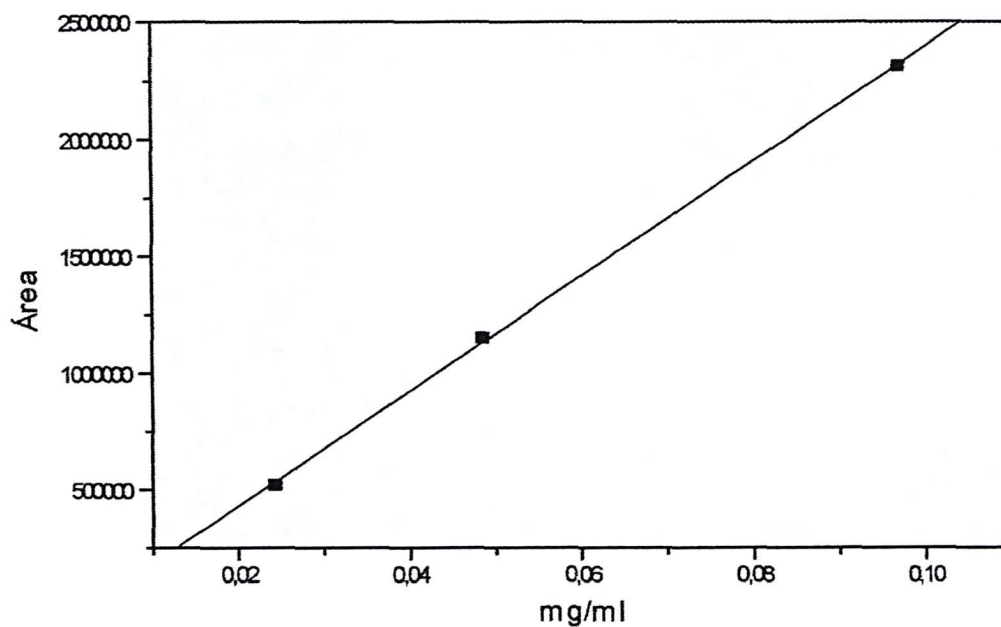
FIGURA 24 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL1. EQUAÇÃO DA RETA:  $Y = A + BX$  ONDE  $A = -60021$  E  $B = 24558486,00884$ .

TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20 $\mu$ l) DA SUBSTÂNCIA AL2

Concentração (mg/ml)	Área
0,192	6275845
0,128	4109932
0,064	2070161

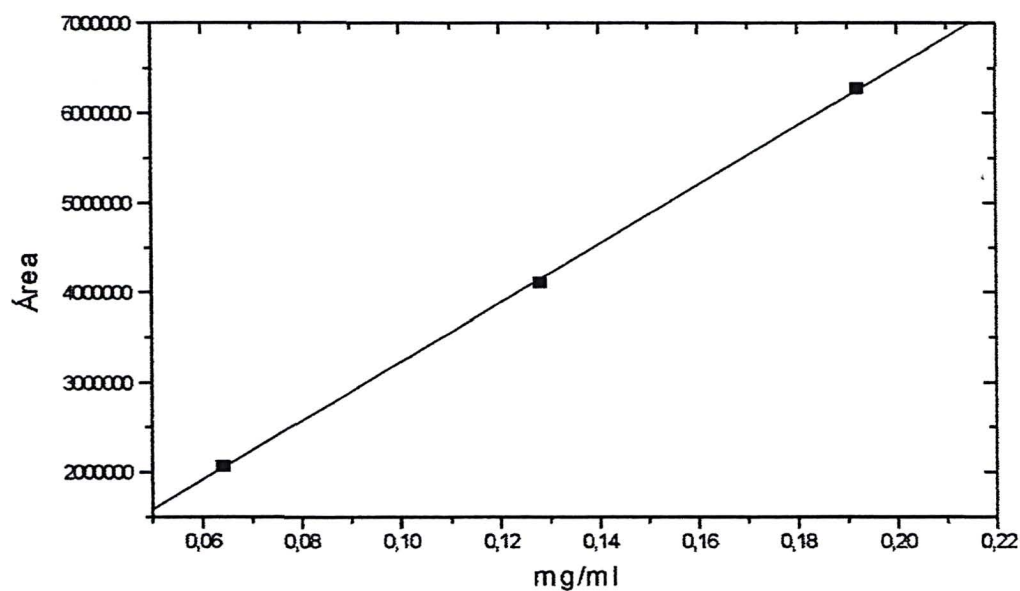
FIGURA 25 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL2. EQUAÇÃO DA RETA:  $Y = A + BX$  ONDE  $A = -53704,66667$  E  $B = 32856906,25$ .

TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS INJEÇÕES (20 $\mu$ l) DA SUBSTÂNCIA AL3

Concentração (mg/ml)	Área
0,08	3763440
0,04	1751730
0,02	892459

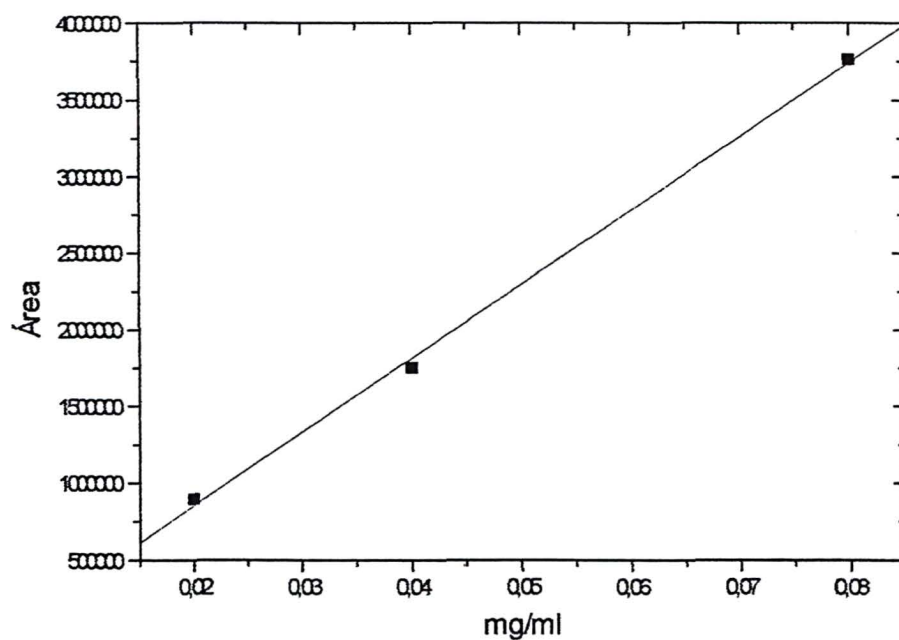
FIGURA 26 - CURVA DE CALIBRAÇÃO: CONCENTRAÇÃO (mg/ml) X ÁREA DO PICO PARA A SUBSTÂNCIA AL3. EQUAÇÃO DA RETA:  $Y = A + BX$  ONDE  $A = -113396$  E  $B = 48198692,85714$ .



TABELA 10 - QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CLAE ANALÍTICA

Substâncias isoladas	Concentração das substâncias na fração AcOEt (%)	Quantidade da substância na fração AcOEt (g)	Concentração mínima da substância na planta (%)
AL1	12,27	1,12	$5,28 \times 10^{-1}$
AL2	4,27	$3,89 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^{-1}$
AL3	0,39	$3,5 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O teste para avaliação da atividade antibacteriana realizado com as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* para o extrato hidroalcoólico e as frações acetato de etila e diclorometano nas mesmas concentrações e condições revelou ausência desta atividade para os microrganismos testados, embora para algumas espécies de *Acacia* tal atividade tenha sido detectada com estes mesmos microrganismos (HOFFMANN *et al.*, (1993); KHAN *et al.*, (1980) e ALI *et al.*, (2001)).

A quantidade de amostra utilizada para impregnação dos discos de papel foi de 1.000 µg, 500 µg, 250 µg e 125 µg. O teste indicou que mesmo utilizando discos de papel impregnados com concentrações de amostra muito superiores a concentração presente no disco de cloranfenicol (30 µg) utilizado como controle não houve nenhuma alteração quanto aos resultados, mostrando que essas concentrações mesmo altas não foram suficientes para inibir o crescimento das colônias de cada uma das cepas bacterianas testadas com relação ao aparecimento dos halos de inibição após 24 horas de incubação das mesmas. Observou-se a formação de um halo de inibição claro e visível de 25 mm para o disco contendo cloranfenicol em todas as placas semeadas e um crescimento positivo das colônias no teste controle após às 24 horas de incubação das placas semeadas; indicando a efetividade do método.

#### 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O teste de avaliação da atividade antifúngica realizado com os isolados de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Rhizoctonia sp.*, para a fração

acetato de etila apresentaram atividade inibitória de 10,5%, 15,9 % e 30 % respectivamente. Com relação ao fungo *Cylindrocladium spathulatum* houve atividade pouco significativa (1,65 %). O teste indicou que os melhores resultados foram verificados na inibição do crescimento de *Rhizoctonia* sp. Os resultados estão indicados na tabela 11.

TABELA 11 - RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA - MÉDIA ENTRE AS DUAS PERPENDICULARES FORMADAS PELO CRESCIMENTO MICELIAL DOS PATÓGENOS (mm) E INIBIÇÃO (%) DO HALO DE CRESCIMENTO NA FRAÇÃO TESTADA

	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Cylindrocladium spathulatum</i>		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Colletotrichum acutatum</i>	
	(média entre os diâmetros da colônia mm)	% de inibição	(média entre os diâmetros da colônia mm)	% de inibição	(média entre os diâmetros da colônia mm)	% de inibição	(média entre os diâmetros da colônia mm)	% de inibição
Controle	84,5	-	84,9	-	90	-	60,50	-
Amostra	75,61	10,50	83,50	1,60	62,8	30	50,83	15,9

## 6 CONCLUSÕES

A fração acetato de etila das flores de *Acacia longifolia*, apresentou reação de Shinoda (detecção de flavonóides) fortemente positiva. A partir desta, foram isolados uma flavanona e dois de seus heterosídeos. Por meio de métodos espectroscópicos e físico-químicos, a flavanona foi identificada como sendo a naringenina e seus heterosídeos como sendo a 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenina e a 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenina.

Foi desenvolvido um sistema de CLAE para avaliar quantitativamente os flavonóides isolados da fração acetato de etila obtida das flores do vegetal. Por meio da aplicação deste sistema foi possível verificar um teor mínimo de 0,528 % (m/m) de 5- $\beta$ -D-galactosil-naringenina, sendo majoritário em relação a 5- $\beta$ -D-glucosil-naringenina com um teor mínimo de 0,2 % (m/m) e a naringenina com teor mínimo em torno de 0,018 % (m/m).

O extrato bruto hidroalcoólico e as frações diclorometano e acetato de etila não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas, contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *E.coli*, mesmo tendo sido utilizadas concentrações até 50 vezes superior ao padrão de cloranfenicol.

No teste de atividade antifúngica, a fração acetato de etila, na concentração de 500 ppm, apresentou significativa ação inibitória sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. com um percentual de inibição de 30 %. Nos demais fitopatógenos, houve uma ação menos pronunciada, a fração testada inibiu 15,9 % e 10,5 % do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* respectivamente. Para o fungo *Cylindrocladium spathulatum* não houve resposta significativa na concentração utilizada para este teste. Estes dados são úteis uma vez que a moderna agricultura baseia-se no uso indiscriminado de agentes químicos, colocando em risco o meio ambiente. Os resultados desta prática, por vezes catastróficos, conseguiram despertar os pesquisadores para a busca de tecnologias que não favoreçam o desequilíbrio ecológico. Assim, o controle biológico de doenças em plantas através do uso de produtos naturais apresenta-se como alternativa importante, segura e eficaz.

Deve-se ter em vista a importância da pesquisa interdisciplinar em produtos naturais, onde buscou-se aliar a fitoquímica diante de um enfoque técnico-científico com uma proposição de trabalho que privilegiou a fitopatologia e a microbiologia como formas de abrir novas perspectivas de aplicabilidade do vegetal em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL-ENEIN, H.Y. Naringenin, anti-ulcer, histidine descarboxilase inhibitor. **Drugs of Future**, 9(9), p. 653-654, 1984.
- AHMED, K.H.; KHATTAB, A.M.; EL-KHRISY, E.A.M.; HAMID, A.Z.A. Constituents and molluscicidal activity of *Acacia saligna*, *Chrysanthemum coronarium* and *Chrysanthemum parthenium*. **Bull. Nath. Res. Cent.**, 24 (1), p.13-25, 1999.
- ALI, M.S.; AZHAR, I.; AHMAD, V.U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of Mimosaceus plants. **Pharm. Biol.**, 39(1), p. 43-46, 2001.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR., A.; LEOMAR, C. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Inst. Oswaldo Cruz**, 95 (3), p. 367-373, 2000.
- ANAN, E.D. A flavonone from roots de *Acacia longifolia* Leguminosae. **Indian J. of Heterocycl. Chem.**, 7(1), p. 63-66, 1997.
- ANDREEVA, O.A.; BANDEUYKAWA, V.A.; LEONT'EVA, T.P.; REKKARRUT,S.A. Flavonoids of *Vicia truncullata* Fisc.ex. Breb. and their pharmacological activity. **Restit. Resur.**, 23(1), p. 96-100, 1987.
- ARGAWAL, O. P. The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid. **Agents and actions**, 12(3), p. 298-302, 1982.
- ASAD, S.F.; SINGH, S.; AHMAD, A.; HADI, S.M. Flavonoids: antioxidants in diet and potential anticancer agents. **Med. Sci. Res.**, 26(11), p. 723-728, 1998.
- AUER, C.G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**, 32, p. 49-51, 1986.
- AYOUB, S.M.H.; YANKOV, L. Molluscicidal properties of the Sudan acacias. **Fitoterapia**, 58(5), p. 363-366, 1987.
- BABU, S.P.S.; SARKAR, D.; GHOSH, N.K.; SAHA, A.; SUKUL, N.C.; BHATTACHARYA, S. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **Jpn. J. Pharmacol.**, 74(4), p. 451-454, 1997.
- BAE, E.A.; HAN, M.J.; KIM, D.H. In-vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. **Planta Medica**, 65(5), p. 442-442, 1999.

- BARAKAT, H.H.; SOOLEMAN, A.M.; HUSSEIN, S.A.M.; IBRAHIEM, O.A.; NAWWAR, M.A.M. Flavonoid galloyl glucosides from the pods of *Acacia farnesiana*. **Phytochemistry**, 51 (1), p. 139-142, 1999.
- BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; KOMISSARENKO, N.F. Comparative evaluation of the effect of some flavonoids on changes in the gastric wall of reserpine-treated or immobilized mice. **Khim. Farm. Zh.**, 17(8), p. 946-51, 1983.
- BARNES, S.; BLAIR, H.C. Genistein for use in inhibiting osteoclasts and reduction of bone reabsorption. **US. Res. Found.**, 1996. 38p.
- BARNES, S.; SFAKIANOS, J.; COWARD, L.; KIRK, M. Soy isoflavonoids and cancer prevention: Underlying biochemical and pharmacological issues. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 401, p. 87-100, 1996.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Minas Gerais: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1986. v.2. 377p.
- BAUMANN, J.; WURM, G.; BRUCHHAUSEN, H. Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their O<sub>2</sub><sup>-</sup> - scavenging properties. **Arch. Pharm.**, 313(4), p. 330-337, 1980.
- BEILER, J.M.; MARTIN, G.J. The inhibition of xanthine oxidase by flavonoids and related compounds. **J. Biol. Chem.**, 192, p. 831-4, 1951.
- BENNETT, J.P.; GOMPERTS, B.D.; WOLLEN-WEBER, E. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. **Arzneim-Forsch**, 31(3), p. 433-437, 1981.
- BENNIE, L.; MALAN, E.; COETZEE, J.; FERREIRA, D. Oligomeric flavonoids. Part 32. Structure and synthesis of ether-linked proteracacinedin and promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia caffra*. **Phytochemistry**, 53 (7), p. 785-793, 2000.
- BENTHAM, G. **Revision of the sub-order Mimoseae**. Trans. Linn. Soc. London, n.30, p. 335-664, 1875.
- BERETZ, A.; STIERLE, A.; SUTTER, B.A.; LAUNAY, J.; CAZENAVE, J.P.A.; ANTON, R. Inhibition of aggregation and adhesion of blood platelets by flavonoids. **Stud. Org. Chem.**, 11, p. 421-425, 1981.
- BESCHIA, M.A.; LEONTE, A.; OANCEA, I. Phenolic components whit biological activity III. Determination of components in water plants. **Bull. Univ. Galati.**, 6(5), p. 23-27, 1982.

- BEZAKOVA, L.; MASTEROVA, I.; PAULIKOVA, I.; PSENAK, M. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie**, 51(2), p. 126-7, 1996.
- BHARGAVA, A.; SRIVASTAVA, A.; KUMBHARE, V. Antifungal activity of polyphenolic complex of *Acacia nilotica* bark. **Indian For.**, 124 (5), p. 292-298, 1998.
- BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. **J. of Ethnopharmacol.**, 49(2), p. 53-67, 1993.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Paris: Editorial Acribia, 1993.
- BUKART, A. **Las Leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. Buenos Aires: ACME, 1952. 569p.
- BURKART, A. Leguminosas. In: Dimitri, M.J. **Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería**. Buenos Aires: ACME, v.1, p.467-538, 1978.
- BURKART, A. Leguminosas. In: REITZ, R. (ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299p.
- BURKART, A. Leguminosae. In: BURKART, A., BURKART, N.S.T. de; BACIGALUPO, N.M. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Buenos Aires: Colección Científica del INTA, 1987. Tomo VI, III, p.442-738.
- BUSHNELL, O.A.; FUKUDA, M.; TAKASHI, M. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. **Pacific Sc.**, 4(3), p. 167-183, 1950.
- CÁCERES, J.M.S. de L. ***Acacia longifolia* (Andr.) Willd.**, 1999. Disponível na internet no endereço ou
- CASSELS, B.K.; DAJAS, F.J.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.J.; SILVEIRA, R.H. Flavonoid and biflavonoid derivatives, their pharmaceutical compositions, their anxiolytic activity. **PCT. Int. Appl.**, 1995. 54p.
- CHAKRABORTY, E.; DAS, S.R. In vitro and in vivo effects of some natural products against experimental amoebiasis caused by *Entamoeba histolytica*. **Agricultural and Biological Res.**, 5(1-2), p. 29-36, 1989.
- CHANG, W.S.; LEE, Y.J.; LEE, F.J.; CHIANG, H. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res.**, 13(4), p. 2165-2170, 1993.

- CHIMANGA, K.; De BRUYNE, T.; HU, J.P.; COS, P.; APERS, S.; PIETERS, L.; TONA, L.; KAMBU, K.; BERGHE, D.V.; VLIETINCK, A.J. Constituents from *Morinda morindoids* leaves as inhibitors of xanthine-oxidase and scavengers of superoxide anions. **Pharm. Pharmacol. Commun.**, 5(6), p. 419-424, 1999.
- CHHABRA, S.C.; UISO, F.C. A survey of the medicine plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**, 4, p.307-316, 1990.
- CLARKE-LEWIS, J.W.; DAINIS, I. Flavan derivatives new glycoside and other extractives from *Acacia exiophylla*. **Aust. J. Chem.**, 21 (2), p.425-37, 1968.
- CLARKE-LEWIS, J.W.; KATECAR, G.F.; MORTIMER, P.J. Flavan derivates IV teracacidina, a new leuco anthocianidin from *Acacia intertexta*. **J. Chem. Soc.**, p. 499-503, 1961.
- COETZEE, J.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Oligomeric flavonoids. Part 29. Structure and synthesis of novel ether-linked [4-0-4] BIS-teracinidins. **Tetrahedron**, 54(31), p. 9153-9160, 1998.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.1, p.310
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Boston: Houghton Mifflin, 1968. 396p.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 643p.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- DAFALLASH, A.A.; AL, M.Z. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. **American J. of Chinese Medicine**, 24(3-4), p.263-269, 1996.
- DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; DRI, P.; ZILLI, C.; NEGRO, P.D. The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of *Chamomilla recutita*. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 213, p.481-484, 1986.
- DESHPANDE, V.N.; PATIL, A.D. Flavonoid of *Acacia catechu* Neartwood. **Ind. J. of Chem. Soc.**, 20B (7), p.628, 1981.
- DEY, P.M; HARBONE, J.B. **Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1997. 554p.

- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. London: John Wiley, 1998. 466p.
- Di STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.
- DOMINGUEZ, X.A. **Métodos de investigación fitoquímica**. México: Limusa, 1973.
- DREWES, S.E.; ISLEY, A.H. Isolation of 3-methoxy-fisetin from *Acacia mearnsii*. **Chem. Comum.**, 20, p.1246-1247, 1968.
- DREWES, S.E.; ROUX, D.G. A new flavan 3,4-diol from *Acacia auriculiformis* by paper ionophoresis. **Biochem. J.**, 18, p.483-500, 1966.
- DUKIC, N.M.M., BUDINCEVIC, M.M.; MIHAJLOVIC, B.A.; GASIC, O.S. Antioxidant activity of plant phenolic flavonoids and phenolic acids. **J. Chem. Soc.**, 59(11), p.823-8, 1994.
- DU PREEZ, I.C.; ROUX, D.G. Novel flavan 3,4-diols from *Acacia cultriformis*. **J. Chem. Soc.**, 13, p.1800-1804, 1970.
- EADE, R.A.; McDONALD, F.J.; SIMES, J.J.H. Extractives of Australian timbers: XIV. Triterpene glycosides of *Acacia myrtifolia*. **Aust. J. Chem.**, 26(4), p. 839-844, 1973.
- ELIAS, T.S. Mimosoideae. In: POLHIL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, v.2, p.143-152, 1981.
- ELISABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **J. of Ethnopharmacol.**, 6(1), p. 21-128, 1986.
- EL-MOUSALLAMY, A.M.D.; BARAKAT, H.H.; SOOLEMAN, A.M.A.; AWADALLAH, S. Polyphenols of *Acacia raddiana*. **Phytochemistry**, 30(11), p. 3767-3768, 1991.
- EL-SHAFAE, A.M.; EL-DOMIATY, M.M. Flavonoidal constituents of the flowers of *Acacia saligna*. **Zagazig J. Pharm. Sci.**, 7 (1), p. 48-53, 1998.
- ELSHEIKH, S.H.; BASHIR, A.K.; SULIMAN, S.M.; WADDILA, M.E. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercariae and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **International Jour. of Crude Drug Res.**, 28(4), p. 241-245, 1990.
- EL SISSI, H.I.; EL SHERBEINY, A.E.A. The flavonoids components of the leaves of *Acacia saligna*. **Qual. Plant. Mater. Veg.**, 14 (3), p. 257-266, 1967.
- EL-TAHIR, A.; SATTI, G.M.H.; KHALID, S.A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Acacia nilotica*. **Phytotherapy Res.**, 13(6), p. 474-478, 1999.

- EVANS, W.C. **Trease y Evans: Farmacognosia**. 13 ed. Mexico, D.F.: Nueva editorial Interamericana, 1991. 901p.
- EVANS, W.C. **"Trease and Evans" Pharmacognosy**. 14 ed. London: W.B. Saunders, 1996. 612p.
- FALCO, M.; JUAN, X.V. Isolation of hyperoside (quercetin-3-D-galactoside) from the flowers of *Acacia melanoxylon*. **Naturewissenschaften**, 51(19), p. 462-463, 1964.
- FEWTRELL, C.M.S.; GOMPERTS, B.D. Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. **Nature**, 265(5595), p. 635-6, 1977.
- FOO, L.Y. Configuration and conformation of dihydroflavonols from *Acacia melanoxylon*. **Phytochemistry**, 26(3), p. 813-817, 1987.
- FOO, L.Y. Isolation of [4-O-4]-linked biflavonoids from *Acacia melanoxylon* first examples of a new class of single ether-linked proanthocyanidin dimers. **J. Chem. Soc.**, 20, p. 1505-1506, 1989.
- FOTSIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H.; HASE, T.; MONTESANO, R.; SCHEWEIGERER, L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. **J. Nutr.**, 125(3S), p. 790(S)-7(S), 1995.
- FOURIER, T.G.; ROUX, D.G.; DU PREEZ, I.C. 3', 4', 7, 8-tetra-hydroxy flavonoids from the heartwood of *Acacia nigrescens* and their conversion products. **Phytochemistry**, 11 (5), p. 1763-70, 1974.
- GAO, G.; QIN, X.; LI, M.; FENG, X. Pharmacognosy of chinese *Crataegus* leaves. **Tieman Chan. Yu Kaifa**, 6(4), p. 27-35, 1994.
- GHOSH, M.; SINHA, B.; SUKUL, N.C.; MAHATO, S.B. Antifilarial effect of two terpenoids isolated from *Acacia auriculiformis*. **Indian J. of Experimental Biology**, 31(7), p. 604-606, 1993.
- GHOSH, N.K.; SINHA, B.S.P.; SUKUL, N.C.; ITO, A. Cestocidal activity of *Acacia auriculiformis*. **J. of Helminthology**, 70(2), p. 171-172, 1996.
- GILANI, A.H.; SHAHEEN, F.; ZAMAN, M.; JANBAZSHAH, B.H.; AKHTAR, M.S. Studies on antihypertensive and antispasmodic activities of methanol extract of *Acacia nilotica* pods. **Phytotherapy Res.**, 13(8), p. 665-669, 1999.
- GONZALEZ, M.E.; ABARCA, F.M.; CARRASCO, F. Flavonoids: potent inhibitors of poliovirus RNA synthesis. **Antiviral Chem.**, 1(3), p. 203-209, 1990.

- GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R.; ADLERCREUTZ, H. Method for treatment of menopausal and premenstrual symptoms. **PCT. Int. Appl.**, 1994. 10p.
- GOTO, M.; KOMIYA, T. Constituents and their biological activities of *Artemisia capillaris*. **Gendai Tokyo Igaku**, 4(1), p. 61-66, 1983.
- GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, 49(516), p. 315-320, 1997.
- GRIFFITHS, K.; MORTON, M.S.; DENIS, L. Certain aspects of molecular endocrinology that related to the influence of dietary factors pathogenesis of prostate cancer. **Eur. Urol.**, 35(5/6), p. 443-455, 1999.
- HARBONE, J.B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. London: Chapman and Hall, 1988.
- HASHIMOTO, T.; AGA, H.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of anti-*Helicobacter pylori* compounds from *Polygonum tinctorium*. **Nat. Med.**, 53(1), p. 27-31, 1999.
- HELDT, H.W. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1997. 522p.
- HOFFMANN, J.J.; TIMMERMANN, B.N.; McLAUGHLIN, S.P.; PUNNAPAYAK, H. Potential activity of plants from the southwestern United States. **International J. of Pharmacognosy**, 31(2), p. 101-115, 1993.
- HU, C.Q.; CHEN, K.; SHI, Q.; KILKUSKII, R.E.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 10. Acacetin-7-O- $\beta$ -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. **J. of Nat. Prod.**, 57(1), p. 42-51, 1994.
- HUSSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, 26(9), p. 248-9, 1987.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytotherapy Res.**, 13(1), p. 31-36, 1999.
- HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants. (Angiospermae)**. Oxford: Clarendon Press, v.1, 1964. 516p.
- HYALIJ, M. J. Effect of molluscicides and cucaricides on some freshwater snails and cercariae. **Geobios.**, 26 (4), p. 211-213, 1999.

- IGILE, G.O.; OLISZEK, W.; JURZYSTA, M.; BURDA, S.; FAFUNSO, M.; FASANMADE, A.A. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. **J. Agric. Food Chem.**, 42(11), p. 2445-8, 1994.
- IMPERATO, F. A new chalcone glycoside and cernuoside from the flowers of *Acacia dealbata*. **Experientia**, 38 (1), p. 66-7, 488, 1967.
- IMPERATO, F. A new chalcone glycoside and esosalipurpuroside from *Acacia cyanophylla*. **Phytochemistry**, 17 (4), p. 822-3, 1978.
- IMPERATO, F. A chalcone glycoside from *Acacia dealbata*. **Phytochemistry**, 2 (2), p. 480-1, 1982.
- JAYASEKHAR, P.; MOHANAN, P.V.; RATHINAM, K. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. **Indian J. of Pharmacol.**, 29(6), p. 426-428, 1997.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998.
- JUNG, H.A.; PARK, J.C.; CHUNG, H.Y.; KIM, J.; CHOI, J.S. Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from leaves of *Eriobotrya japonica*. **Arch. Pharmacol. Res.**, 22(2), p. 213-18, 1999.
- KAUL, T.N.; MIDDLETON, E.; ORGRA, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **J. Med. Virol.**, 15(1), p. 71-9, 1985.
- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, 63(5), p. 896-9, 1999.
- KERBER, V.A. **Flavonóides e cumarinas de *Acacia longifolia* (Andr.) Will. Leguminosae-Mimosoideae**. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1988. Dissertação de mestrado.
- KERBER, V.A.; SILVA, G.A.A.B. Flavonoids of *Acacia longifolia* (Andr) Willd-Leguminosae-Mimosoidae. **Rev. Bras. Farm.**, 74(1), p. 16-18, 1993.
- KHALID, S.A.; FARAUK, A.; GEARY, T.G.; JENSEN, J.B. Potential antimalarial candidates from African plants: an *in vitro* approach using *Plasmodium falciparum*. **J. of Ethnopharmacol.**, 15(2), p. 201-9, 1986.
- KHALID, S.A.; YAGI, S.M.; KHRISTOVA, P.; DUDDECK, H. (+)-catechin-5-galloyl ester as a novel natural polyphenol from the bark of *Acacia nilotica* of Sudanese origin. **Planta Medica**, 55(6), p. 556-8, 1989.

- KHAN, M.S.Y.; CHAWLA, G.; JAVED, K.; KHAN, M.H. Chemical investigation of the pods of *Acacia leucophloea* Roxb. **Indian Drugs**, 28(2), p.97-8, 1990.
- KHAN, M.R.; NDAALIO, G.; NKUNYA, M.H.H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A.N. Studies on African medicinal plants: 1- Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. **Planta medica**, Suppl (0), p. 91-7, 1980.
- KIRILLOVA, V.V.; KONDZHARIYA, A.T. Characterization of tannins in some subtropical plants. **Khim. Prir. Soedin.**, 4, p. 602-3, 1987.
- LAEKEMAN, G.M.; CLAEYS, M.; RWANGABO, P.G.; HERMAN, A.G.; VLEIETINK, A.J. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. **Planta Medica**, 52(6), p. 433, 1986.
- LEE, J.H.; QIU, F.; WALLER, G.R.; CHOU, C.H. Three new flavonolgalloyl glycosides from leaves of *Acacia confusa*. **J. of Nat. Prod.**, 63 (5), p. 710-2, 2000.
- LIN, J.K.; CHEN, T.S.; CHEN, C.S. Flavonoids as nonpeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors for hypertension treatment. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 1994. 16p.
- LORENTE, F.J.; FERRERAS, F.; BARBERAN, F.A.T. 6-C-glicosil naringenin from flowers of *Acacia retinoids*. **Phytochemistry**, 21 (6), p. 461-2, 1982.
- LOZOYA, X.; MECKES, M.; ABOU-ZAID, M.; TORTORIELLO, J.; NOZZOLILLO, C.; ARNASON, J.T. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and of spasmolytic principle. **Arch. Med. Res.**, 25(1), p. 11-15, 1994.
- McANLIS, G., McENNY, J.; YOUNG, I. Effects of a flavonoid-rich diet on plasma and susceptibility of LDL oxidation. **R. Soc. Chem.**, 240, p. 174-7, 1999.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York, Heidelberg, 1970. 354p.
- MACKENZIE, A.M. Mearnsitrin: a new [methoxylated] flavonol glycoside [a rhamnoside] from the leaves of *Acacia mearnsii*. **Tetrahedron Lett.**, 26, p. 2519-50, 1967.
- MALAN, E. 7,8,4'- trihydroxy-3,3'-dimethoxy flavone from the heartwood of *Acacia nigrescens*. **Phytochemistry**, 33(3), p. 733-4, 1993.
- MALAN, E. A (4b (r) 5)-linked proteracacidin dimer from heartwood of *Acacia caffra*. **Phytochemistry**, 40(5), p.1519-21, 1995.
- MALAN, E.; SIREEPARSAD, A.; SWINNY, E.; FERREIRA, D. The structure and synthesis of a 7,8,4'- trihydroxyflavan-epioritin dimer from *Acacia caffra*. **Phytochemistry**, 44(3), p. 529-531, 1997.

- MALAN, E.; SIREEPARSAD, A. The structure and synthesis of the first dimeric proteracacinidins from *Acacia galpinii*. **Phytochemistry**, 38(1), p. 237-9, 1995.
- MARCANO, D.; MASAHISA, H. **Fitoquímica orgânica**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1991. p.81.
- MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas – Leguminosas**. Santa Maria: Ed. UFSM, 1997. 200p.
- 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.**, 41, p. 221-6, 1951.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113p.
- McGRAW, L.J.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Prostaglandin synthesis inhibitory activity in Zulu, Xhosa e Soho medicinal plants. **Phytotherapy Res.**, 11(2), p.113-7, 1997.
- MIDDLETON, E.; DRZEWIECKI, G. Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen – induced histamine release from human basophilis. **Biochem. Pharmacol.**, 31(7), p.1449-53, 1982.
- MIDDLETON, E.; DRZEWIECKI, G.; TATUM, J. The effects of citrus flavonoids on human basophil and neutrophil function. **Planta Medica**, 53 (4), p. 325-8, 1987.
- MING,L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI,L.C. (Ed.). **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência - Um Guia de Estudos Multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996. p.69-86.
- MOLTENI, A.; MOLTENI, L.B.; PERSKY, V.J. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. **J. Nutr.**, 125(3S), p. 751(S)-6(S), 1995.
- MOON, T.C.; PARK, J. O.; CHUNG, K.; SON, K.H.; KIM, H.P.; KANG, S.S.; CHANG, H.W.; CHUNG, K.C. Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Loicera japonica*. **Yakhak Hoechi**, 43(1), p. 117-23, 1999.
- MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, 26(8), p. 2231-4, 1987.
- MUSCI, I. Virus-inactivating and virus reproduction-inhibiting activities of flavonoids. **Kieserl. Orvostud.**, 37(4), p. 442-8, 1985.

- MUSTAFA, N.K.; TANIRA, M.O.M.; DAR, F.K.; NSANZE, H. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* subsp. *nilotica* fruit extracts. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, 5(9), p. 583-6, 1999.
- NAUCHINI, Y.G. Rutin from flowers of Japanese *Acacia popova*. **Tr. Vich. Inst. Kranifeln Vkujona Plom Plovidiv.**, 10, p. 233-300, 1963.
- NAGEM, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G.; SILVA, M.C. Flavonoids in cultivators of soybean: antioxidant action. **South Braz. J. Chem.**, 1(1), p. 11-22, 1993.
- NIKAIDO, T.; OHSMOTO, T.; SANKAWA, U.; TOMIMORI, T.; MIYAICHI, Y.; IMOTO, V. Inhibitors of cAMP phosphodiesterase in medicinal plants. Part XIII: Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. **Chem. Pharm. Bull.**, 36(2), p. 654-61, 1988.
- NORO, T.; ODA, Y.; MIYASE, T.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S. Studies of enzyme inhibitors. V. Inhibitors of xanthine oxidase from *Alpinia galanga*. **Chem. Pharm. Bull.**, 36(1), p. 244-8, 1989.
- NUNES, D.S. Chemical approaches to the study of ethnomedicinal. In: BALICK, M.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S (ed.). **Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University, p. 41-47, 1996.
- OKUDA, J.; MIWA, I.; INAGAKI, K.; HORI, T.; NAKAYAMA, M. Inhibition of reductase by 3', 4'-dihydroxylavavones. **Chem. Pharm. Bull.**, 32(2), p. 767-72, 1984.
- PARIS, R.A. The flavonoids pigments of several species of *Acacia*. **Bull. Soc. Chem. Biol.**, 35, p.655-60, 1953.
- PARMAR, N.S; GHOSH, M.N. The anti-inflammatory and anti-gastric ulcer activities of some biflavonoids. **Bull Jawaharlal Inst. Post-Grad. Med. Educ. Res.**, 1(1), p. 6-11, 1976.
- PARMAR, N.S. The gastric anti-ulcer activity of naringenin, a specific histidine decarboxilase inhibitor. **Int. J. Tiss. Reac.**, 5(4), p. 415-20, 1983.
- PEARL, I.A.; DARLINF, S.F. Phenolic extractives of *Salix purpurea* bark. **Phytochemistry**, 9, p. 1277-1281, 1970.
- PETERSON, G.; BARNES, S. Genistein inhibitors both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. **Cell Growth Differ.**, 7(10), p. 1345-51, 1996.

- PIERONI, A.; HEIMLER, D.; PIETERS, L.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea*) leaves. *Pharmazie*, 51(10), p. 765-68, 1996.
- POPOCCA, J.; AGUILAR, A.; ALONSO, D.; VILLARREAL, M.L. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *J. of Ethnopharmacology*, 59(3), p.173-77, 1998.
- RAO, J.R.; AHAMED, M.A.; SUBRAMANYAM, G.; SAHIB, P.E. Chemical investigation of *Acacia leucophloea* flowers. *Indian J. of Nat. Prod.*, 7(1), p.20-21, 1991.
- ROJAS, V.R.S.; SOMOZA, B.; ORTEGA, T.; VILLAR, A.M. Isolation of vasodilator active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata*. *Planta Medica*, 62(3), p. 272-74, 1996.
- ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora da UFV, 2001. 279p.
- ROUX, D.G.; EVELYN, S.R. Condensed tannins 2. Biogenesis of condensed tannins based on leucoanthocyanis. *Biochem. Jour.*, 70(2), p. 344-49, 1958.
- ROUX, D.G.; PAULUS, E. Condensed tannins 6. Biochemical and stereochemical interrelationships of (+)-fustin from black wattle heartwood (*Acacia molissima*). *Biochem. Jour.*, 77(2), p. 315-20, 1960.
- RUCKUSTUHL, M.; BERETZ, A.; ANTON, R.; LANDY, Y. Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 28(4), p. 543-8, 1979.
- SARKAR, P.; SINHA, B.S.P.; SUKUL, N.C. Antifilarial effect of a combination of botanicals of *Acacia auriculiformis* and *Centella asiatica* on canine dirofilariases. *Pharmaceutical Biology*, 36(2), p.107-10, 1998.
- SHAH, B.H.; SAFDAR, B.; VIRANI, S.S.; NAWAZ, Z.; SAEED, S.A.; GILANI, A.H. The antiplatelet aggregatory activity of *Acacia nilotica* is due to blockade of calcium influx through membrane calcium channels. *Channels Gen. Pharmacol.*, 29(2), p. 251-55, 1997.
- SAHU, N.P.; ACHARI, B.; BANERJEE, S. 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 49 (5), p.1425-26, 1998.
- SALEEM, M.; AHMAD, M.; AHMAD, A.; KOKHAR, I. Phytochemical evaluation of *Acacia aneura*. *Sci. Int (Lahore)*, 4(4), p.385-6, 1992.

- SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin – A textbook of Pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 1992. 320p.
- SAMBANATHAN, P.T.; VISWANATHAN, S.; REDDY, K.; RAMACHANDRAN, S.; KAMESWARAN, L. Analgesic activity of certain bioflavonoids. **Indian Journal of Pharm. Sci.**, 47(6), p. 230-1, 1985.
- SCHULZE – MENZ, G.K. Reihe Rosales. In: MELCHIOR, H.A. **Engler's syclabus der pflanzenfamilien**. Berlin: Gerbrüder Borntraeger, v.2, p.193-242, 1964.
- SCHWARTZ, A.; MIDDLETON, E. Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. **Immunopharmacol.**, 7(2), p. 115-26, 1984.
- SHAHAT, A.A.; HAMMOUDA, F.; ISMAIL, S.I.; AZZAM, S.A.; BRUYNE, T.; LASURE, A.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. Anti-complementary activity of *Crataegus sinaica*. **Planta Medica**, 62(1), p. 10-13, 1996.
- SHIN, K.H.; WOO, W.S.; LEE, C.K. Sedative action of flavonoids and saponin from the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. spinous Burge. **Soul Tachakkyo Saengyak Yonguso Opjukjip**, 20, p. 82-86, 1981.
- SHARMA, P.; DAYAL, R.; AYYAR, K.S. Chemical constituents of *Acacia catechu* leaves. **J.of Indian Chem. Soc.**, 74(1), p. 60, 1997.
- SHARMA, P.; DAYAL, R.; AYYAR, K.S. Acylglucosterols from *Acacia catechu*. **J.of Med. Arom. Sci.**, 21(4), p. 1002-5, 1999.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5 ed. New York: Jonh Wiley, 1991. 419p.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1986. 176p.
- SINGLA, A.; PATHAK, K. Anti-inflammatory studies on *Euphorbia prostata*. **J. of Ethnopharmacol.**, 27, p. 55-61, 1989.
- SINGLA, A.; PATHAK, K. Topical antiinflammatory effects of *Euphorbia prostata* on carrageenan-induced footpad edema in mice. **J. of Ethnopharmacol.**, 29, p. 291-4, 1990.
- SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacol.**, 45, p. 177-81, 1995.

SOUSA, R.L.; MARLETA, M.A. Inhibition of cytochrome P-450 activity in rat liver microsomes by the naturally occurring flavonoids, quercetin. **Biochem. Biophys.**, 240(1), p. 345-57, 1985.

SOICHE, H.; PESCHLAW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, 53(1), p. 37-9, 1987.

SPADA, A.; CAMERONI, R. The flavonic pigments of the pollen of *Acacia dealbata*. **Gazz. Chim. Ital.**, 86, p. 965-79, 1956.

SRIVASTAVA, A.K.; CHIASSON, J.L. Effect of quercetin on serine/threonine and tyrosine protein kinases. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 213, p.315-18, 1986.

SWEES, J.; RABAK, J.; DABROWSKI, L.; DUNIEC, Z.; MICHALSKA, Z.; GRYGLEWSKI, R.J. Antiaggregatory effects of flavonoids *in vivo* and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro*. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, 36 (5), p. 455-63, 1984.

SYROV, V.N.; KUSHBAKTOVA, Z.A.; ABZALOVA, M.K.H.; SULTANOV, M.B. Prospects for the study of flavonoids as hypolipidemic and antiatherosclerotic agents. **Dolk. Akad. Nauk.**, 3(3), p. 48-50, 1985.

TAKHTAJAN, A. **Flowering plants – Origin and dispersal**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1969. 310p.

UBEDA, A.; VILLAR, A. Relaxant actions of khellin on vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Pharm.**, 41(4), p. 236-41, 1989.

UBEDA, A.; ESTEVE, M.L.; ALCARAZ, M.J.; CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Effects of flavonoids on cytochrome P-450 from rat liver microsomes: inhibition of enzyme activities and protection against peroxidative damage. **Phytother. Res.**, 9(6), p. 416-20, 1995.

ULUBELEN, A.; ÖKSÜZ, S.; BOZOK-JOHANSSON, C.; CELIK, C.; VOELTER, W. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. **Planta Medica**, 66(5), p. 458-62, 2000.

USHIO, S.; YUI, T.C. Anti-allergic substances from Chinese medicinal plants. **Adv. Chin. Med. Mater. Res. Int. Symp.**, p.171-180, 1984.

TANAGRO S/A. **Aspectos técnicos e econômicos do sistema agrossilvopastoral com acácia negra no Rio Grande do Sul**. In: Encontro brasileiro de economia e planejamento florestal. Anais: Embrapa /CNPq. Sistemas agroflorestais no Brasil aspectos técnicos e econômicos. v.I, p. 211-219, 1992.

- TANG, R.; CHEN, K.; COSENTINO, M.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 12 apigenin-7-O- $\beta$ -D-glicopiranoside, an anti-HIV principle from *Kummerowia striata*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 4(3), p. 455-8, 1994.
- TAPPI, G.; SPADA, A.; CAMERONI, R. Flavone pigments of the pollen of *Acacia dealbata*. **Gazz. Chim. Ital.**, 85, p. 703-13, 1955.
- THIEME, H.; KHOGALI, A. Isolation of apigenin 6-8-BIS-(C- $\beta$ -D-glicopiranoside) from leaves of *Acacia farnesiana*. **Pharmazie**, 29 (5), p. 352, 1974.
- TONDERA, M.; FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. **Z. Naturforsch. Brosc.**, 49(3-4), p. 235-40, 1994.
- VALSAKUMARI, M.K.; SULOCHANA, N. Chemical examination of *Acacia leucophloea* Willd. **J. Indian Chem. Soc.**, 68(12), p. 673-4, 1991.
- VANDEBOGAERDE, A.; ZANOLI, P.; PLEIA, G.; TRUZZI, C.; KAMAHABWA, P.; De WITTE, P.; MERTEVEDE, W.; BARALDI, M. Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 65(4), 2000.
- VARMA, S.D.; KINOSHITA, J.H. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. **Science**, 188(4194), p. 215-16, 1976.
- VOIRIN, B.; BAYET, C.; BONVIN, J.F.; NAIR, A.G.R.; KRISHNAKUMARY, P. Flavonoids from the flowers of *Acacia latifolia*. **J. of Nat. Prod.**, 49(5), p. 943, 1986.
- ZUANAZZI, J.A.S. (IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (ed). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ Ed. UFSC, p.489-516, 1999.
- YOSHIMOTO, T.; FURUKAWA, M.; YAMAMOTO, S.; HIOUE, T.; WATANABE, S.K. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 116(2), p. 612-18, 1983.
- YUTAKA, E.; USHIO, S. Biologically active constituents of *Centipeda minima*: isolation of a new phenol ester and antiallergy activity of a sesquiterpene lactone. **Chem. Pharm. Bull.**, 33(9), p. 4091-4, 1985.
- WADSWORTH, T.L.; KOOP, D.R. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. **Chemico-biological Interactions**. 137(1), p. 43-58, 2001.

WAGNER, H. and WOLFF. **New natural products and plant drug with pharmacological, biological and therapeutical activity.** NewYork: Sringer, 1977.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. of Ethnopharmacol.**, 51, p. 239-254, 1996.

WANG, H; JOSEPH, J.A. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC 12 cells. **Free Radical Biol. Med.**, 27(5/6), p .683-94, 1999.

WASSEL, G.M.; ABDEL-WAHAB, S.M.; ABOUTABL, E.A.; AMMAR, N.M.; AFIFI, M.S. Phytochemical examination and biological studies of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd growing in Egypt. **Egypt J. Pharm. Science**, 33(1-2), p.327-40, 1992.

WELTON, A.F.; TOBIAS, L.D.; FIEDLER, N.C.; ANDERSON, W.; HOPE, W.; MEYERS, K.; COFFEY, J.W. Effect of flavonoid on arachidonic metabolism. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 213, p. 231-42, 1986.

WISEMAN, H. Role of dietary phytoestrogens in the protection against cancer and heart disease. **Biochem. Soc. Trans.**, 24(3), p. 795-800, 1996.

WOLLEN-WEBER, E.; SEIGLER, D.S. Flavonols from the exudate of *Acacia neovernicosa*. **Phytochemistry**, 21 (5), p.1063-6, 1982.