

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

VIVIANE DE CASSIA PEREIRA

Potencial fitotóxico de *Serjania lethalis* A. St-Hil

**São Carlos- SP
Brasil
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

VIVIANE DE CASSIA PEREIRA

Potencial fitotóxico de *Serjania lethalis* A. St-Hil

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos- SP
Brasil
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P436pf

Pereira, Viviane de Cassia.

Potencial fitotóxico de *Serjania lethalis* A. St-Hil / Viviane de Cassia Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
157 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Alelopatia. 2. Fitotoxicidade. 3. Germinação. 4. Crescimento de plântulas. 5. Anatomia vegetal. I. Título.

CDD: 581.23 (20^a)

Viviane de Cassia Pereira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 29 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Sonia Gualtieri

Profª. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri
(Orientadora)

1º Examinador

Maria Inês Salgueiro Lima

Profª. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima
PPGERN/UFSCar

2º Examinador

Andréia Pereira Matos

Profª. Dra. Andréia Pereira Matos
UNICEP/São Carlos-SP

*Tenho andado distraído,
Impaciente e indeciso
E ainda estou confuso,
Só que agora é diferente:
Sou tão tranquilo e tão contente.*

*Quantas chances desperdicei,
Quando o que eu mais queria
Era provar pra todo o mundo
Que eu não precisava
Provar nada pra ninguém.*

*Me fiz em mil pedaços
Pra você juntar
E queria sempre achar
Explicação pro que eu sentia.
Como um anjo caído
Fiz questão de esquecer
Que mentir pra si mesmo
É sempre a pior mentira,
Mas não sou mais
Tão criança a ponto de saber tudo.*

*Já não me preocupo se eu não sei por que.
Às vezes, o que eu vejo, quase ninguém vê
E eu sei que você sabe, quase sem querer
Que eu vejo o mesmo que você.*

*Tão correto e tão bonito
O infinito é realmente
Um dos deuses mais lindos!
Sei que, às vezes, uso
Palavras repetidas,
Mas quais são as palavras
Que nunca são ditas?*

*Me disseram que você
Estava chorando
E foi então que eu percebi
Como lhe quero tanto.*

*Já não me preocupo se eu não sei por que.
Às vezes, o que eu vejo, quase ninguém vê
E eu sei que você sabe, quase sem querer
Que eu quero o mesmo que você.*

(Renato Russo)

Agradecimentos

A Deus por todas as oportunidades e por ter me dado o dom do interesse por tudo o que tem vida.

À Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, pela orientação, paciência, amizade e oportunidade.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho por toda a ajuda com a química, por entender minhas limitações, pela amizade, descontração e pela paciência.

A todo o pessoal do laboratório de sementes (Maristela, Maria Augusta, Simoni, Patrícia, Leandro, Lafayette, Luciana) agradeço pela companhia, ajuda e pelas divertidas conversas!

À Dra. Maristela Imatomi pela ajuda e correções. À Patrícia e Simoni pela ajuda e por compartilharem experiências com o trabalho. Ao Carlos Casali pela ajuda com os equipamentos.

À Profa Dra. Ana Tereza Lombardi pelas valiosas dicas. Ao Prof. Dr. Marcos Arduin pela ajuda com as micrografias.

À Profa Dra. Maria Inês Salgueiro Lima pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário, pela amizade e correções.

Aos alunos do laboratório do Edinho pelas inúmeras ajudas com material, técnicas e equipamentos. Ao Enzo por toda colaboração com o trabalho e pelas explicações.

À minha família pelo carinho, em especial à minha mãe Lourdes, pelo carinho, paciência e ajuda. Aos meus irmãos Daniel, Reinaldo e Fernando pelo apoio e interesse.

Ao Gabriel Abdalla por todos os muitos anos de boa convivência, pela paciência, carinho, companhia e por ter contado muitas sementes.

À tia Bernadete e tio Abdalla por todo o apoio, interesse e descontração.

À Raquel Miatto, pela amizade e agradável companhia. Á Grazi pela amizade e desabafos e ao Pavel por ter me apresentado à UFSCar e ter me ajudado nas coletas.

À Joana, pela amizade de longa data, ainda que distante, valeu Jô!

Ao Dr. Edson Zucolotto e família pelas agradáveis e produtivas conversas e ajuda com as acupunturas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Aos membros da banca pelas correções e sugestões

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida. À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo geral

O estudo do potencial fitotóxico de espécies do cerrado tem sido de grande interesse para pesquisadores que buscam na natureza fontes de substâncias com propriedades semelhantes às de herbicidas sintéticos. *Serjania lethalis* A. St- Hil. é uma liana encontrada no cerrado. Trata-se de uma espécie com conhecidas propriedades fitoterápicas e rica em compostos como saponinas, taninos e catequinas, de grande interesse para indústria farmacêutica. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar e comprovar o potencial fitotóxico de folhas jovens e maduras de *S. lethalis*, primeiramente sobre a germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.), onde foram adicionados extratos aquosos de folhas jovens e maduras sobre sementes e plântulas de capim-colonião nas concentrações 10; 7,5; 5,0 e 2,5%. Posteriormente foi verificado seu efeito sobre as variáveis de germinação e crescimento. Os resultados indicam que os extratos aquosos de folhas interferem na germinação de sementes e no crescimento das plântulas, porém a fase de maturação das folhas não produziu resultados muito distintos para a maioria das variáveis analisadas. Frações de extratos aquosos e etanólicos foram testadas sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L). Estas foram obtidas por meio de cromatografia de coluna, foram testadas em três diferentes concentrações (0,8; 0,4 e 0,2 mg.mL⁻¹). Verificou-se que as frações Fje2, Fje3, Fje5 e Fme1 inibiram o crescimento dos coleótilos. As mesmas frações foram testadas sobre o crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) e os resultados apontaram redução do crescimento das raízes e da parte aérea das plântulas. Assim, foi decidido verificar se esta redução ocorria a partir de alterações a nível celular. Então as mesmas frações foram testadas sobre o crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*). Os resultados mostraram reduções significativas do comprimento das células em relação ao tratamento controle. As frações ativas foram fracionadas por meio de cromatografia

líquida de média pressão a fim de isolar as substâncias com potencial fitotóxico. Análises das frações ativas levaram à identificação de três procianidinas diméricas e também procianidinas poliméricas (taninos condensados), sendo uma procianidina sem registro na literatura. Ressalta-se que as substâncias ativas identificadas foram encontradas nas folhas jovens. Para identificação das substâncias foi utilizado um Espectrômetro de Massas e um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear. Também foram feitas extrações de saponinas a partir das folhas, raízes e caules de *S.lethalis*. Para tanto, utilizou-se metanol e água, e em seguida foi feita uma pré-purificação, utilizando-se a técnica de Extração em Fase Sólida, onde foram utilizados os eluentes metanol e água em diferentes proporções. As frações obtidas foram analisadas por meio de um Espectrômetro de Massas. Foi testado o potencial fitotóxico destas frações através de um bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. Verificou-se que as frações contendo saponinas inibiram o crescimento dos coleótilos, comprovando sua propriedade fitotóxica. Este trabalho comprovou a existência de substâncias fitotóxicas em folhas, raízes e caules de *S. lethalis*. Também foi possível identificar uma procianidina presente no extrato etanólico de folhas jovens, sem registro na literatura.

Palavras-chave: Fitotoxicidade, cromatografia, saponinas, catequinas, taninos.

Abstract

The study of the phytotoxic potential of species of the Cerrado has been of great interest to researchers seeking in nature sources of substances with properties similar to those of synthetic herbicides. *Serjania lethalis* A. St- Hil. is a liana found in the cerrado. This is a species with known properties and rich in compounds such as saponins and catechins, with great interest to the pharmaceutical industry. This research aimed to verify the phytotoxic potential of young and mature leaves aqueous extracts of *S. lethalis* primarily on germination and seedling growth of grass (*Panicum maximum* Jacq.), which were added aqueous extracts of young and mature leaves on seeds and seedlings of guinea grass in concentrations of 10, 7.5, 5.0 and 2.5%. After this, we evaluated their effect on germination and growth variables. The results indicate that the aqueous extracts interfere with seed germination and seedling growth, but the maturation of leaves did not produce very different results for most of the variables analyzed. Fractions of aqueous and ethanolic extracts were tested on the growth of wheat coleoptile (*Triticum aestivum* L). In this bioassay, fractions from ethanol and aqueous extracts, obtained by column chromatography, were tested at three different concentrations (0.8, 0.4 and 0.2 mg.mL⁻¹). It has been found that certain fractions were presented as phytotoxic, because they inhibited the growth of coleoptiles. Later, these fractions were tested about the growth of seedlings of sesame (*Sesamum indicum* L.), at the same concentrations, and the results showed that roots and aerial parts of seedlings had his grow the reduced. Thus, it was decided to verify such changes at the cellular level. Then the same fractions were tested about the growth of cells of metaxylem sesame (*Sesamum indicum*). Results showed significant reductions in the length of the cells compared to control treatment. The active fractions were fractionated by medium pressure liquid chromatography in order to isolate substances with potential phytotoxicity. Analysis of the active fractions led to the identification of three dimeric procyanidins and polymeric procyanidins (condensed tannins), and a procyanidin

unregistered in the literature. It should be noted that the active substances identified were found in young leaves. To identify the substances it was used a Mass Spectrometer and a Nuclear Magnetic Resonance equipment. It was also performed an extraction of saponins from the leaves, roots and stems of *S.lethalis*. Therefore, it was used methanol and water, and then it was performed a pre-purification, using the technique of Solid Phase Extraction, where eluents methanol and water were used in different proportions. The fractions obtained were analyzed through a Mass Spectrometer. It was tested the phytotoxic potential of extracted saponins, through a bioassay of coleoptile wheat growth at concentrations 0.8, 0.4 and 0.2 mg. mL⁻¹. It was found that saponins inhibited the growth of coleoptiles, proving its phytotoxic property. This work proved the phytotoxicity of the species *S. lethalis*. It was also possible to identify a procyanidin present in the ethanol extract of young leaves, with no record in the literature.

Keywords: Phytotoxicity, chromatography, saponins, catechins, tannins.

Lista de Figuras

Introdução Geral

Figura 1. Mapa de localização do cerrado no território brasileiro (IBAMA, 2009)	20
Figura 2. Indução da produção de aleloquímicos nas plantas (Kim e Shin, 2004 modificado)	22
Figura 3. Rotas de produção dos metabólitos vegetais (Braz-Filho, 2010 modificado)	24
Figura 4. Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários vegetais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007 modificado)	25
Figura 5. Indivíduos de <i>Serjania lethalis</i> fotografados na reserva de cerrado da UFSCar destacado as folhas (Pereira, 2011)	27
Figura 6. Folhas de <i>Serjania lethalis</i> coletadas da reserva de cerrado da UFSCar (Pereira, 2012)	28
Figuras 7. Estruturas comuns de saponinas triterpênicas (Simões et al., 2003) a) Ácido Ursólico b) Lupeol	29
Figuras 8. Saponinas isoladas de <i>Sapindus saponaria</i> que apresentou atividade antifúngica contra espécies do gênero <i>Candida</i> (Tsuzuki et al., 2007)	29
Figuras 9. Estrutura dos alcalóides a) Alantoína (Veiga et al., 2005) b) Atropina (Canaes e Fatibello-Filho, 2006)	30
Figuras 10. Estrutura dos terpenóides a) Mentol (Caramori e Oliveira, 2009) e b) Linalol (Cifuentes et al., 2010)	31

Figuras 11. Estruturas de alcalóides indólicos a) Triptamina b) Neostigmina	31
Figuras 12. Estruturas de alguns flavonóides. a) Flavona b) Chalcona c) Flavanona (Simões et al., 2003)	32
Figuras 13. Flavonóides. a) Quercetina b) Rutina (Veloso et al., 2009)	32
Figuras 14. Estrutura de algumas cumarinas. a) Varfarina b) Acenocumarol	33
Figuras 15. Estrutura de algumas lignanas. a) Virolina e Surinamensina b) Honoquinol.....	34
Figuras 16. Estrutura de alguns taninos. a) Taninos hidrolisáveis b) Taninos condensados...	35

Capítulo I

Figura 1. Porcentagem de germinação (a), velocidade de germinação (b) e sincronia (c) do processo germinativo de sementes de capim-colonião frente aos extratos aquosos de folhas de <i>Serjania lethalis</i> . As barras verticais indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam as diferenças significativas entre as concentrações de cada extrato	58
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2. Comprimento total (a), da raiz (b) e da parte aérea (c) de plântulas de capim-colonião frente aos extratos de <i>Serjania lethalis</i> . As barras verticais indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam as diferenças significativas entre as concentrações de cada extrato	60
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 3 . Plântulas de capim- colonião (<i>Panicum maximum</i>) crescidas nos tratamentos controle (água destilada) e extrato aquoso de folhas jovens (a) e maduras (b) nas concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10%. (Foto: Pereira, 2011)	62
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo II

Figura 1. Coluna cromatográfica utilizada para o fracionamento dos extratos de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i> (Foto: Pereira, 2012)	77
Figura 2. Fluxograma do processo de extração e isolamento de substâncias fitotóxicas presentes em folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i> . Folhas jovens extraídas com etanol (je), folhas maduras extraídas com etanol (me), folhas jovens extraídas com água (ja), folhas maduras extraídas com água (ma). Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Espectrometria de Massas (LC-EM), Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP)	78
Figura 3. Cromatografias de camada delgada (CCD) das sub-frações Fje3C (a) e Fje3D (b) com substâncias purificadas. (Foto: Pereira, 2012)	78
Figura 4. Efeito das frações etanólicas de folhas jovens (Fje1 a Fje6) e folhas maduras (Fme1 a Fme4); frações aquosas de folhas jovens (Fja1) e folhas maduras (Fma1 a Fma3) de <i>Serjania lethalis</i> sobre o comprimento de coleótilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i>). (*) indicam as frações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo O Controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL [®]	82
Figura 5. Procianidinas epiméricas presentes na sub-fração Fje2A	84
Figura 6. Procianidinas diméricas tipo-A presentes na sub-fração Fje2B	85
Figura 7. Procianidina dímero tipo-B presente na sub-fração Fje2C	86
Figura 8. Catequinas oligoméricas (taninos condensados) presentes na sub-fração Fje3A	86

Capítulo III

Figura 1. Comprimento da raiz e parte aérea de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), submetidas ao efeito das frações de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. Valores com

letras diferentes indicam diferença significativa, pelo teste ANOVA a 0,05% de probabilidade. As barras verticais indicam o desvio padrão em relação às médias 108

Figura 2. Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) após sete dias em contato com frações de extratos de folhas de *Serjania lethalis* na concentração 0.8 mg mL⁻¹ a) Controle b) Fje2 c) Fje3 d) Fje5 e) Fme1. (Foto: Pereira, 2012) 110

Figura 3. Células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*) crescidas nos tratamentos de controle negativo (a), Fje2 (b), Fje3 (c), Fje5 (d), Fme1 (e) na concentração de 0.8 mg mL⁻¹. (Foto: Pereira, 2012). Os círculos destacam o comprimento das células 113

Capítulo IV

Figura 1. Extração em fase sólida de amostras de extratos de folha, raiz e caule de *Serjania lethalis* obtidos com metanol e água (Foto: Pereira, 2013) 134

Figura 2. Amostras de cada material vegetal (folhas, raiz e caule) obtidas após a extração em fase sólida, por meio dos protocolos 1 e 2 (Foto: Pereira, 2013). Tubos de vidro com volume de 20mL 136

Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) em diferentes concentrações de saponinas extraídas de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis*. (*) indicam as amostras que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo 138

Figura 4. Efeito das frações provenientes de extratos de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* contendo saponinas e dos controles positivo (solução tampão) e negativo (herbicida GOAL[®]), sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) 139

Anexos

Anexo A. Espectro de RMN- ¹ H referente à sub-fração Fje2A	149
Anexo B. Cromatograma de íons produtos referente à sub-fração Fje2A	149
Anexo C. Espectro <i>Full Scan</i> referente à sub-fração Fje2A	150
Anexo D. Espectros de íons produto referentes à sub-fração Fje2A	150
Anexo E. Espectros de Ultra-violeta referente à sub-fração Fje2A	151
Anexo F. Espectro de RMN- ¹ H referente à sub-fração Fje2B	152
Anexo G. Espectros de Full Scan referente à sub-fração Fje2B	152
Anexo H- Espectros de íons produto referentes à sub-fração Fje2B	153
Anexo I- Espectros de Ultra-violeta referente à sub-fração Fje2B	153
Anexo J. Espectro de RMN- ¹ H referente à sub-fração Fje2C	154
Anexo K- Espectros de Full Scan referentes à sub-fração Fje2C	154
Anexo L- Espectro de Ultra-Violeta referente à sub-fração Fje2C	155
Anexo M- Espectro de RMN- ¹ H referente à sub-fração Fje3A	156
Anexo N- Espectro de Full Scan referente à sub-fração Fje3A	156
Anexo O- Espectros de Full Scan referentes à sub-fração Fje3A	157

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Porcentagem de plântulas anormais e principal anormalidade apresentada em cada tratamento após sete dias em contato com os extratos aquosos de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i>	61
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo II

Tabela 1. Massa obtida de cada fração de extrato aquoso e etanólico de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i>	79
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo III

Tabela 1. Frações de extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras reunidas após a cromatografia de camada delgada (CCD) com seus respectivos códigos: Fje (Extrato etanólico de folhas jovens) Fme (Extrato etanólico de folhas maduras) Fja (Extrato aquoso de folhas jovens) Fma (Extrato aquoso de folhas maduras)	102
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2. Massa obtida de cada fração de extrato aquoso e etanólico de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i>	106
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3. Porcentagem e tipo de anomalia presente em cada concentração de cada fração de extratos de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i> . Necrose (N); Atrofia (A); Inversão Gravitropica (IG)	111
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 4. Comprimento das células do metaxilema (μm) de gergelim (<i>Sesamum indicum</i>), submetidas ao efeito das frações dos extratos de folhas de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações	115
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo IV

Tabela 1. Nomenclatura das frações obtidas de cada material vegetal (folhas, raiz e caule) por meio do protocolo 1 e 2, com seus respectivos eluentes	133
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2. Comprimento médio dos coleótilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) submetidos à atividade do herbicida e das amostras extraídas de folhas, raiz e caule de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações	140
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3. Comprimento médio dos coleótilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) submetidos à atividade do herbicida GOAL [®] e das amostras extraídas de folhas, raiz e caule de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações	141
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	20
Objetivo Geral	36
Objetivos específicos	36
PERGUNTAS DE TRABALHO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO I	48
Atividade fitotóxica de extratos aquosos de folhas de <i>Serjania lethalis</i> A. St-Hil sobre a germinação e crescimento de <i>Panicum maximum</i> Jacq.	
RESUMO	49
ABSTRACT	50
1. Introdução	51
2. Objetivos	53
3. Material e Metodologia	54
3.1 Material Vegetal	54
3.2 Preparo dos extratos	54
3.3 Medidas de pH e Potencial Osmótico	54
3.4 Bioensaio de germinação	55
3.5 Bioensaio de crescimento	55
3.6 Cálculos matemáticos	56
3.7 Análises estatísticas	56
4. Resultados e Discussão	57
4.1 Bioensaio de germinação	57
4.2 Bioensaio de crescimento	59
5. Conclusões	64
6. Referências Bibliográficas	65

CAPÍTULO II	70
Constituintes químicos de folhas jovens e maduras de <i>Serjania lethalis</i> A. St-Hil sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. Introdução	73
2. Objetivos	75
3. Material e Metodologia	76
3.1 <i>Material Vegetal</i>	76
3.2 <i>Extração e isolamento</i>	76
3.3 <i>Atividade fitotóxica das frações sobre coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)</i>	79
3.4 <i>Análises estatísticas</i>	80
3.5 <i>Identificação</i>	80
4. Resultados e Discussão	81
4.1 <i>Rendimento</i>	81
4.2 <i>Atividade fitotóxica das frações sobre coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)</i>	81
5. Conclusões	88
6. Referências Bibliográficas	89
CAPÍTULO III	93
Atividade fitotóxica de <i>Serjania lethalis</i> sobre o crescimento de plântulas e células do metaxilema de gergelim (<i>Sesamum indicum</i>)	
RESUMO	94
ABSTRACT	96
1. Introdução	98
2. Objetivos	100
3. Material e Metodologia	101
3.1 <i>Material Vegetal</i>	101

3.2	<i>Extração</i>	101
3.3	<i>Seleção das frações a serem testadas</i>	103
3.4	<i>Bioensaio de avaliação do crescimento de plântulas de gergelim (Sesamum indicum L.)</i>	103
3.5	<i>Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (Sesamum indicum L.)</i>	104
3.6	<i>Análises estatísticas</i>	105
4	Resultados e Discussão	106
4.1	<i>Rendimento</i>	106
4.2	<i>Crescimento de plântulas de gergelim (Sesamum indicum L.)</i>	106
4.3	<i>Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (Sesamum indicum L.)</i>	112
5	Conclusões	117
6	Referências Bibliográficas	118
CAPÍTULO IV		123
Potencial fitotóxico de saponinas de folhas, raízes e caules de <i>Serjania lethalis</i> A.St-Hil		
	RESUMO	124
	ABSTRACT	126
1	Introdução	128
2	Objetivos	130
3	Material e Metodologia	131
3.1	<i>Material Vegetal</i>	131
3.2	<i>Extração</i>	131
3.2.1	<i>Extração-Protocolo 1</i>	131
3.2.2	<i>Pré- purificação (Solid Phase Extraction, SPE)</i>	132
3.2.3	<i>Extração- Protocolo 2</i>	132
3.2.4	<i>Pré-purificação (Solid Phase Extraction, SPE)</i>	133

3.3. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i>).....	134
3.4 Análise estatística	135
4. Resultados e Discussão	136
4.1 Rendimento	136
4.2 Obtenção de frações ricas em saponinas	136
4.3 Bioensaio de coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	137
5. Conclusões	143
6. Referências Bibliográficas	144
CONCLUSÕES FINAIS	146
ANEXOS	148

Introdução geral

O cerrado brasileiro

O cerrado é considerado uma das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade, trata-se de um *hot spot* (Myers et al., 2000). Foi considerado durante muito tempo um dos biomas brasileiros, porém atualmente este termo não é utilizado pois dentro do cerrado existem fisionomias diferentes, caracterizando cada uma como um bioma, desta forma dentro do cerrado temos os biomas campo tropical (campo limpo), a savana (campo sujo, campo cerrado e cerrado sensu stricto) e a floresta estacional (cerradão) (Batalha, 2011).

Sua abrangência cobre 21% do território nacional (Borlaug, 2002), incluindo os estados da Bahia, Goiás, Piauí, Maranhão, Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (IBAMA, 2009) (Figura 1)



Figura 1. Mapa de localização do cerrado no território brasileiro (IBAMA, 2009).

A biodiversidade do cerrado é menosprezada, sendo o número de plantas endêmicas encontradas em seus limites superior ao encontrado em outras regiões do planeta, além disso, quarenta por cento de sua flora é endêmica (Klink e Machado, 2005).

A degradação do solo, pastoreio e a colonização de espécies exóticas são as maiores ameaças à biodiversidade presentes neste conjunto de biomas. Organizações Não Governamentais (ONGs), pesquisadores e o setor privado têm mantido constante interesse na conservação do cerrado brasileiro (Klink e Machado, 2005). Diante deste fato, considera-se de grande importância levantar dados a respeito de espécies nativas, sejam elas animais ou vegetais. Sendo a alelopatia um fenômeno ecológico que ocorre em diferentes ambientes, consideram-se os dados levantados a respeito das atividades biológicas de plantas do cerrado como uma importante ferramenta para a conservação da flora e conseqüentemente para a compreensão dos mecanismos de equilíbrio biológico do cerrado.

Considerações sobre alelopatia

A alelopatia é um processo que envolve a liberação de substâncias produzidas pelas plantas denominadas aleloquímicos e estes, quando lançados no ambiente podem interferir no crescimento de outras plantas (Mallik, 2005). Mais recentemente o termo alelopatia foi definido pela Sociedade Internacional de Alelopatia (2013) como sendo qualquer processo que envolva metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos que influencie positiva ou negativamente em sistemas naturais ou cultiváveis. Os aleloquímicos apresentaram muitos benefícios na proteção e defesa das plantas contra patógenos e predadores durante o processo evolutivo (Waller, 1999). A alelopatia caracteriza-se pela liberação de substâncias, diferentemente da competição,

que retira ou reduz fatores no ambiente, como água, luz e nutrientes (Ferreira e Áquila, 2000). A indução da produção de aleloquímicos pode-se dar por meio de variações na temperatura, ritmo circadiano, altitude, índice pluviométrico, ataque por herbívoros, dentre outros (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Os aleloquímicos podem ser encontrados nas folhas, sementes, caule, casca, frutos e raízes (Weir et al., 2004) porém, variam em quantidade e qualidade dependendo das condições climáticas (Alves et al., 2002).

A produção de aleloquímicos pode ser regulada por fatores como temperatura, luz solar, sazonalidade, ataque de insetos ou microrganismos, nutrientes (Chou, 1986; Einhellig, 1996). A figura 2 esquematiza os vários meios de indução dos metabólitos secundários nas plantas.

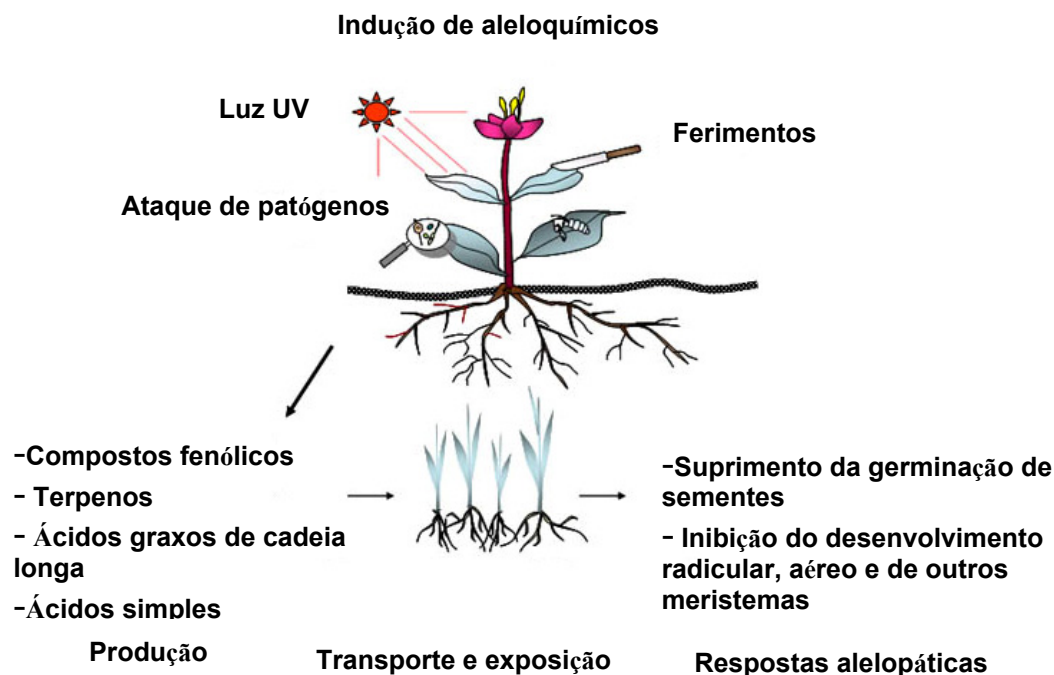


Figura 2. Indução da produção de aleloquímicos nas plantas por fatores abióticos e bióticos

(Kim e Skin, 2004 modificado)

Segundo Ferreira e Aquila (2000) o tipo de vegetação que ocorre em determinada área pode ter um modelo de sucessão que remete às plantas que anteriormente existiam no local,

assim como as substâncias químicas que foram lançadas no meio e ali permaneceram. As espécies vegetais dominantes modificam o ambiente através do sombreamento, umidade e disponibilidade de nutrientes, porém vale ressaltar que a alelopatia também modifica o ambiente e, conseqüentemente, a distribuição das espécies que ocorrerão logo em seguida (Melkania, 1992).

Metabolismo Vegetal

Denomina-se metabolismo o conjunto de reações químicas vitais que ocorrem com a presença de enzimas nas células. Os vegetais produzem dois grupos de produtos químicos, o primeiro é composto por metabólitos primários, ou macromoléculas, nele estão incluídos os lipídeos, protídeos e glicídeos. Este grupo origina através de rotas biossintéticas o segundo grupo de produtos químicos, os chamados metabólitos secundários, ou micromoléculas. Neste grupo estão incluídos compostos como saponinas, taninos, cumarinas, limonóides, alcalóides, flavonóides, dentre outros. (Simões et al., 2003).

Metabolismo Secundário Vegetal

Os produtos do metabolismo secundário agem na defesa do vegetal e nos mecanismos que permitem que se adequem ao meio onde vivem. E tem em sua composição toxinas e substâncias com sabor desagradável para os herbívoros. A interação entre as plantas também é conhecida, não somente entre indivíduos de espécies diferentes como também entre indivíduos da mesma espécie (Simões et al., 2003). A rota de produção dos metabólitos vegetais está representada na figura 3 .

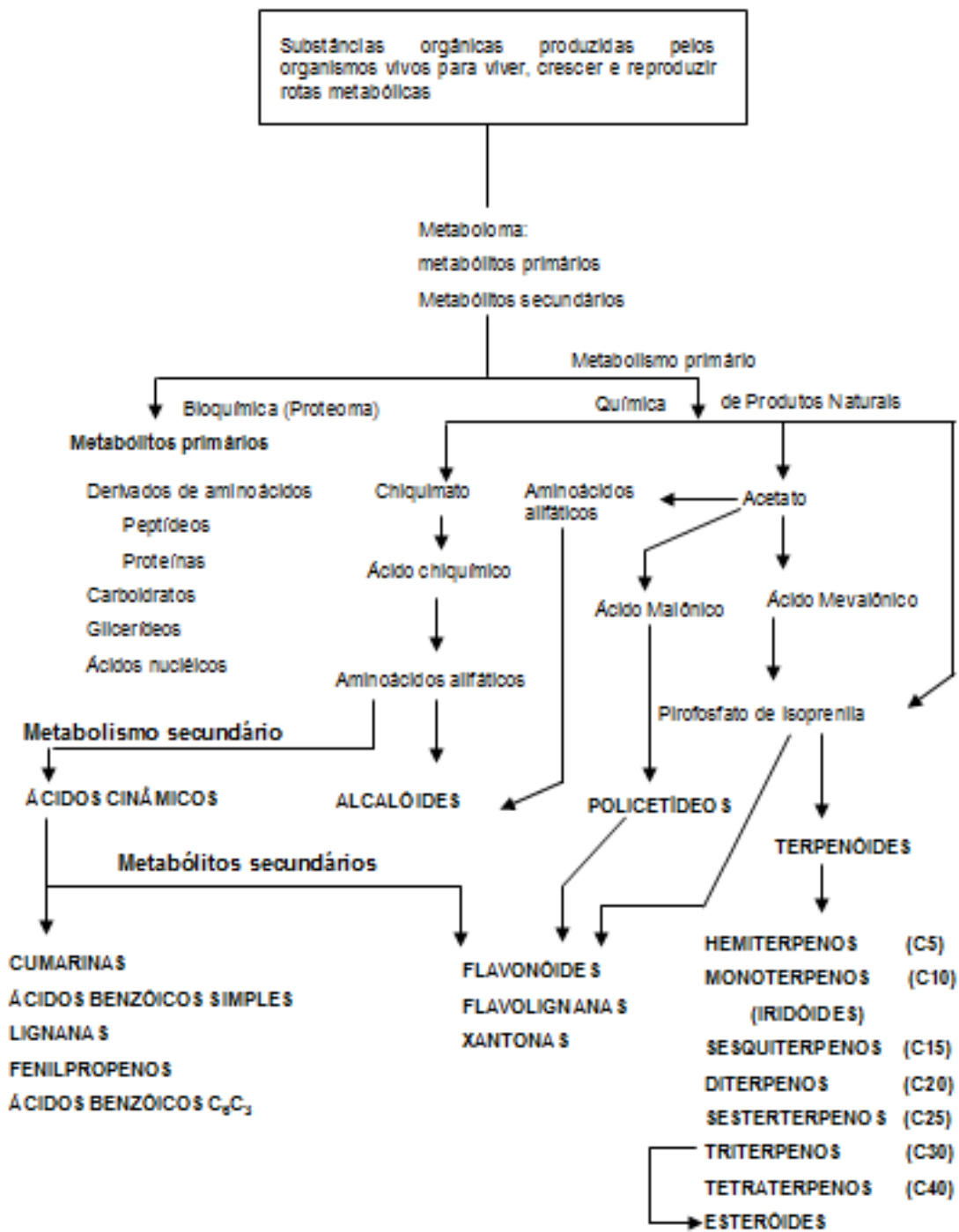


Figura 3. Rotas de produção dos metabólitos vegetais proposta por Braz-Filho (2010 modificado).

A taxa de produção dos metabólitos secundários pode variar entre os vegetais devido às variações ambientais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude e poluição atmosférica, além de

indução por estímulos mecânicos e ataques por patógenos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).
(Figura 4).



Figura 4. Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários vegetais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007 modificado)

Herbicidas naturais

Os compostos do metabolismo secundário vegetal podem ser utilizados como herbicidas naturais, uma vez que inibem o crescimento de plântulas de espécies daninhas, atuando também em nível celular (Grisi et al., 2013).

Atualmente existem alguns herbicidas naturais sendo comercializados, como os bilafanos, ácido pelargônico, glúten de milho, óleo de cravo e 2-Phenethyl-propinato (Copping e Duke, 2007), estes apresentam vantagens em relação aos herbicidas sintéticos pois não causam danos ambientais (Souza-Filho et al., 2006), não apresentam moléculas halogenadas e possuem meia vida menor (Duke et al., 2000; Rimando e Duke, 2006).

Rice (1984) agrupou 14 categorias de compostos que apresentam atividade fitotóxica, dentre eles estão as quinonas, fenóis, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos e alcalóides. Desta forma, a busca por metabólitos secundários para utilização como herbicidas naturais tem sido uma alternativa para a diminuição do uso de herbicidas sintéticos (Grisi, 2010).

A família Sapindaceae

Esta família conta com cerca de 120 gêneros e mais de 1000 espécies amplamente distribuídas em todos os trópicos (Reitz, 1980). Espécies de Sapindaceae apresentam diversas formas de vida, como por exemplo, as lianas dos gêneros *Serjania* Miller e *Paullinia* L. e as árvores de grande porte dos gêneros *Talisia* Aublet e *Cupania* L. (Guarim Neto, 1994). Muitas destas espécies tem sido utilizadas para fins medicinais por apresentarem propriedades diuréticas, estimulantes, expectorantes, sedativas, vermífugas e no tratamento de doenças da pele (Sastri, 1962; Hegnauer, 1970; Kimata et al., 1983; Martinez, 1992).

Serjania lethalis

O gênero *Serjania* pertence à família Sapindaceae e contém cerca de 226 espécies, sendo seu maior centro de distribuição o sul do México, com 48 espécies, mas no Brasil sua ocorrência limita-se a 35 espécies encontradas no planalto central e na costa Atlântica (Acevedo-Rodríguez, 1990). *Serjania lethalis* é uma liana tipicamente encontrada no cerrado brasileiro (Fernandes e Negreiros, 2001), também ocorre nos estados da Bahia, Amazonas, Ceará, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina, além dos países Bolívia e Peru (Acevedo-Rodríguez, 1990) (Figuras 5 e 6).

A espécie *S lethalis* é uma rica fonte de isoprenóides e polifenóis (Hegnauer, 1970). Corrêa (1926) a descreve como uma bela planta ornamental, e como as demais do gênero com grande atividade narcótica, porém mais venenosa que as demais, popularmente conhecida como mata-fome. Teixeira et al (1984) relatam que *Serjania lethalis* apresentou efeitos ictiotóxicos e que serjanosídeos isolados apresentaram-se cerca de 15 vezes mais tóxicos que algumas saponinas. Os efeitos ictiotóxicos causados pelos gêneros *Serjania* e *Paullinia* são conhecidos e muito utilizados na pescaria (Guarim Neto et al., 2000). Também foi encontrada atividade fitotóxica em suas folhas (Pereira et al., 2012).



Figura 5. Indivíduos de *Serjania lethalis* fotografados na reserva de cerrado da UFSCar destacando as folhas (Pereira, V.C. 2011)



Figura 6. Folhas de *Serjania lethalis* coletadas da reserva de cerrado da UFSCar (Pereira, V.C. 2012)

Saponinas

As saponinas pertencem a um vasto grupo de glicosídeos, amplamente distribuídos no reino vegetal e suas propriedades, a seguir descritas, as diferenciam dos demais glicosídeos. As saponinas são solúveis em água e formam espuma quando são agitadas (Tyler et al., 1981). Possuem uma parte lipofílica outra hidrofílica, composta por açúcares que formam cadeias lineares ou ramificadas, também possuem elevada massa molecular (600 a 2000 Dalton) (Simões et al., 2003). São compostos do metabolismo secundário vegetal conhecidos na família Sapindaceae (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006). Estas saponinas são classificadas em dois grupos, de acordo com a natureza do esqueleto de aglicona. O primeiro grupo contém saponinas esteroidais, que são características de monocotiledôneas, o segundo grupo contém saponinas triterpênicas e são comuns em espécies dicotiledôneas (Bruneton, 1995). Alguns dos núcleos mais comuns de saponinas triterpênicas são apresentados na Figura 7 (a e b).

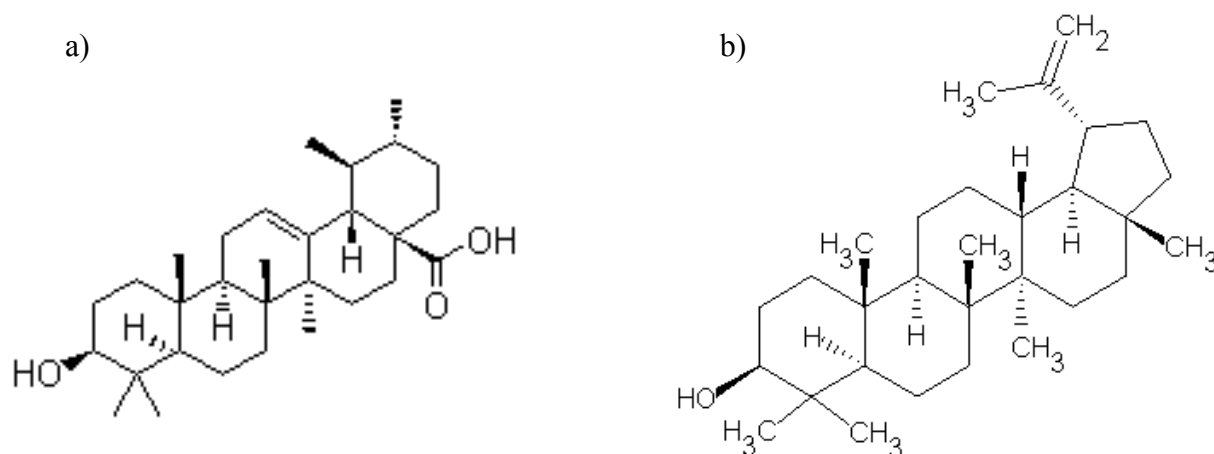


Figura 7. Estruturas comuns de saponinas triterpênicas. a) Ácido Ursólico b) Lupeol (Simões et al., 2003)

São listadas diversas atividades biológicas das saponinas, como atividade hemolítica, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, anti-tumoral, citotóxica, antiviral (Sparg et al., 2004) e reguladora do crescimento de plântulas (Ohara e Ohira, 2003). A figura 8 apresenta saponinas isoladas de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) com atividade antifúngica contra espécies do gênero *Candida* (Tsuzuki et al., 2007)

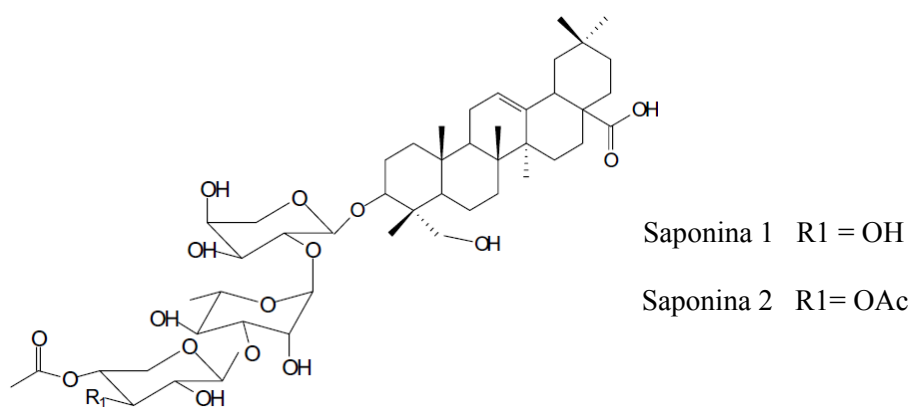


Figura 8. Saponinas isoladas de *Sapindus saponaria* (Tsuzuki et al., 2007)

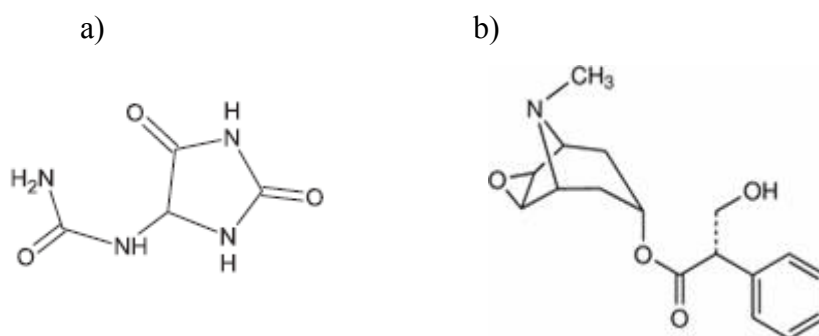
Outras atividades biológicas das saponinas incluem a redução do colesterol no sangue, como descrito no trabalho desenvolvido por Cheek (1971), onde foi adicionada saponina na dieta de frangos, levando à redução do colesterol no sangue e tecido destes animais.

Outros metabólitos vegetais

Os metabólitos vegetais originam-se a partir do metabolismo da glicose, pelo intermédio do ácido chiquímico e do acetato.

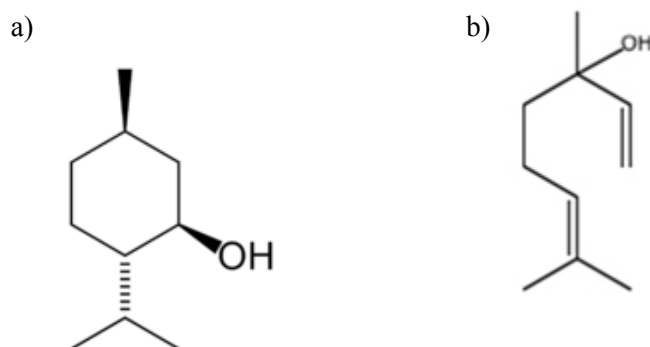
- *Metabólitos secundários derivados do acetato:*

- **Alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos:** Compostos nitrogenados com caráter alcalino, tóxicos para vertebrados e insetos, que evitam predação de plantas ricas nestas substâncias e são amplamente utilizados na indústria farmacêutica (Simões et al., 2003). Figuras 9 (a e b) retiradas de Veiga et al., (2005) e Canaes e Fatibello-Filho (2006), respectivamente



Figuras 9. Estrutura dos alcalóides a) Alantoína b) Atropina

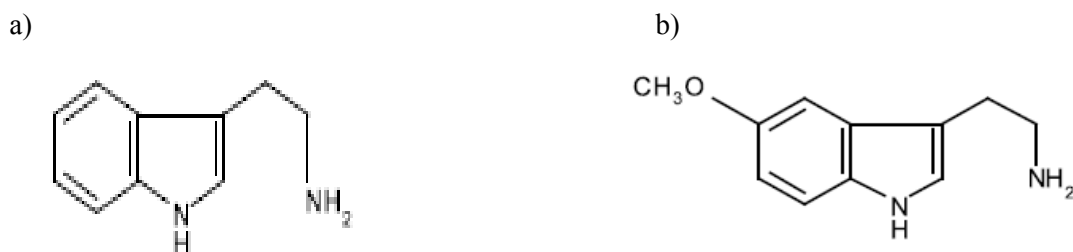
- **Terpenóides:** São derivados do isopreno, pela via do melevonato, subdividindo-se em Hemiterpenos (C5), Monoterpenos (C10), Sesquiterpenos (C15), Diterpenos (C20), Sesterpenos (C25), Triterpenos ou Esteróides (C30) e Tetraterpenos (C40). Figuras 10 (a e b) retiradas de Caramori e Oliveira (2009) e Beltran Cifuentes et al. (2010), respectivamente.



Figuras 10. Estrutura dos terpenóides a) Mentol b) Linalol

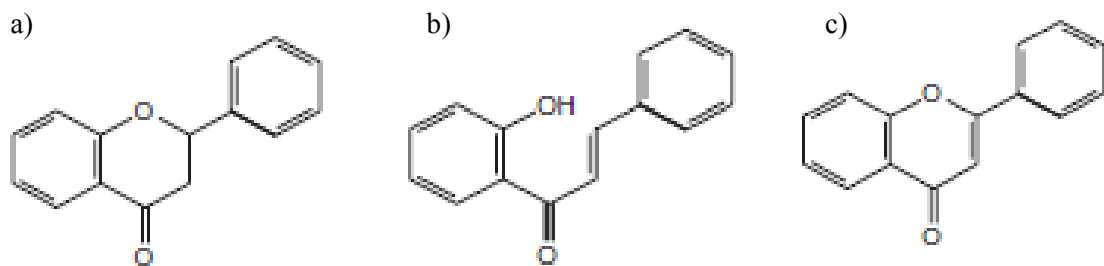
- *Metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico*

- **Alcalóides indólicos:** Derivados do triptofano, este grupo apresenta em torno de 2000 alcalóides. Possuem atividades alucinógenas e são utilizados em terapias neoplásticas, sendo produzidos por plantas e fungos (Simões et al., 2003). Figuras 11 (a e b) retiradas de Oliveira e Koike (2003) e Bravo et al (2010)

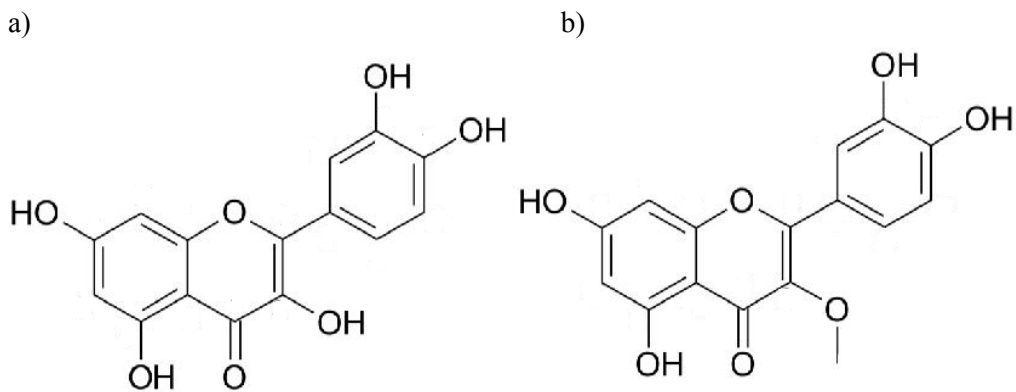


Figuras 11. Estruturas de alcalóides indólicos a) Triptamina b) 5-metoxitriptamina

- **Flavonóides:** Um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados. Existem mais de 4.200 flavonóides . Ocorrem frequentemente oxigenados e às vezes conjugados com açúcares (Simões et al., 2003). Suas funções são proteger os vegetais contra os raios ultra violeta, são antioxidantes, protegem contra herbivoria, são agentes alelopáticos e promovem o controle dos hormônios vegetais (Harbone, 1989; Harbone e Willians, 2000). Figuras 12 (a, b, c), retiradas de Simões et al. (2003) e figuras 13 (a e b) retiradas de Velloso et al. (2009)

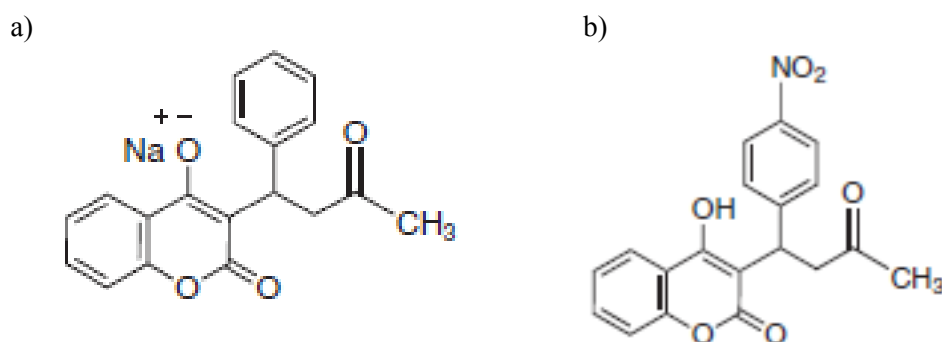


Figuras 12. Estruturas de alguns flavonóides. a) Flavona b) Chalcona c) Flavanona



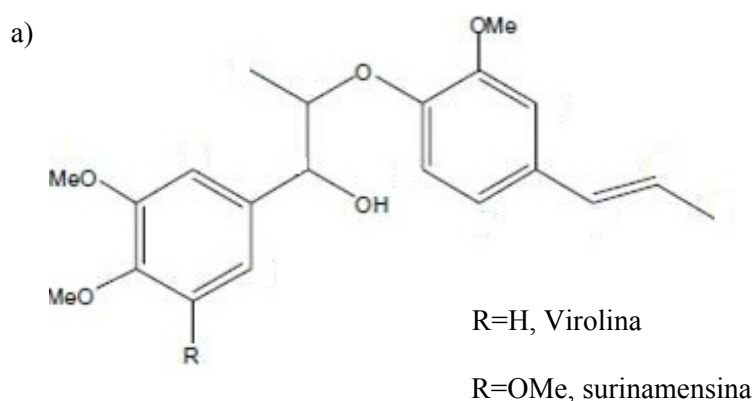
Figuras 13. Flavonóides. a) Quercetina b) Rutina

- **Cumarinas:** Encontradas nos vegetais, fungos e bactérias, as cumarinas predominam nas angiospermas, em todas as partes das plantas. Possuem odor característico e são utilizadas na indústria alimentícia. Apresentam as formas básicas de cromonas e xantonas (Simões et al., 2003). Figuras 14 (a e b) retiradas de Chaves et al. (2010)

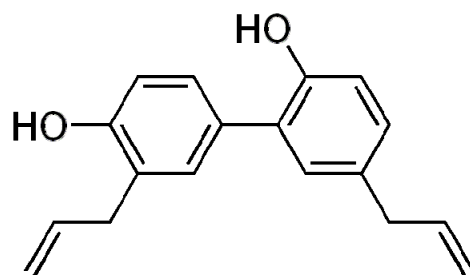


Figuras 14. Estrutura de algumas cumarinas. a) Varfarina b) Acenocumarol

- **Lignanas:** Constituem a parede celular de células vegetais, apresentam propriedades antiinflamatória, antioxidante, relaxante muscular e antifúngica. Acumulam-se nas madeiras após ferimentos mecânicos ou ataques de microorganismos (Simões et al., 2003). Figuras 15 (a e b), retiradas de Borges et al. (2007) e Simões et al. (2003), respectivamente.



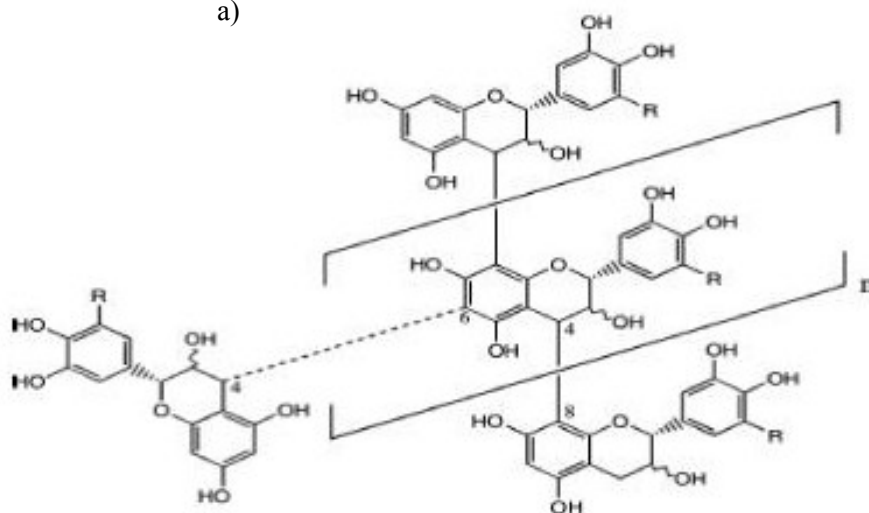
b)

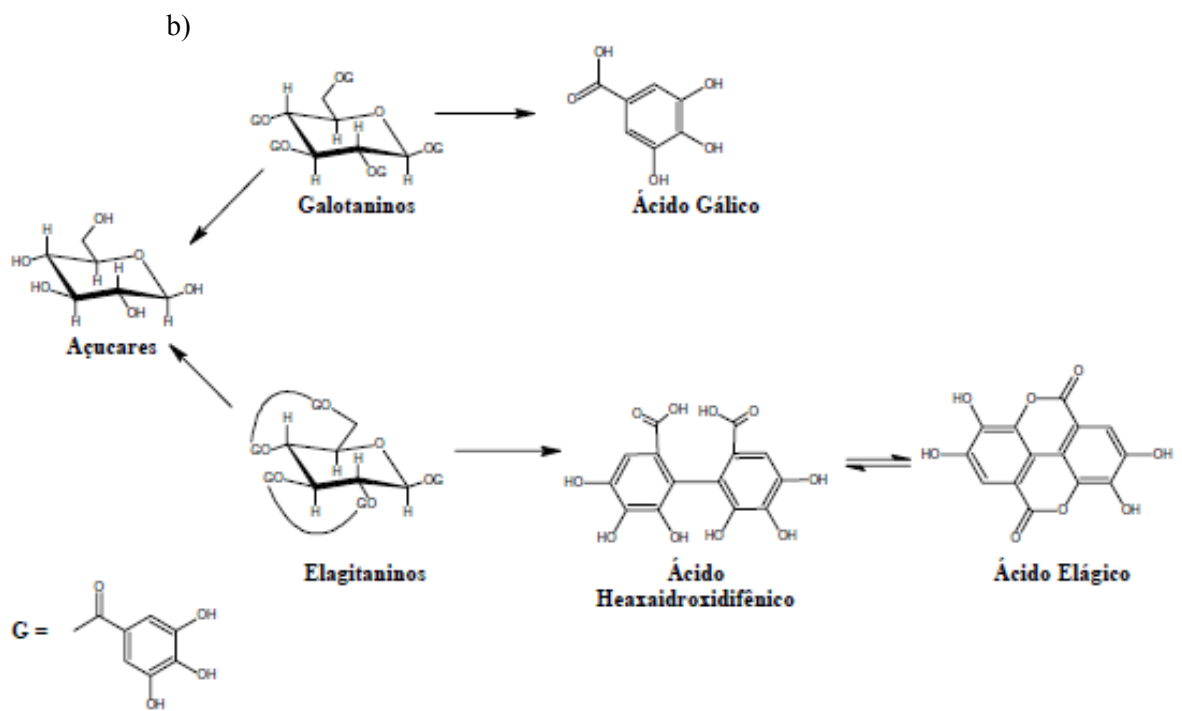


Figuras 15. Estrutura de algumas lignanas. a) Virolina e Surinamensina b) Honoquinol

- **Taninos** : Compostos fenólicos solúveis em água, com massa molar entre 500 e 3000 Dalton. Responsáveis pela adstringência de frutos e produtos vegetais. São divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, estes também são derivados do acetato (Simões et al., 2003). Figuras 16 (a e b) retiradas de Queiroz et al. (2002) e Carneiro et al. (2009), respectivamente

a)





Figuras 16. Estrutura de alguns taninos. a) Taninos hidrolisáveis b) Taninos condensados

Objetivo geral

- Avaliar o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A. St- Hil sobre a germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.);

- Isolar e caracterizar produtos do metabolismo secundário de folhas jovens e maduras que apresentam atividade fitotóxica, por meio de bioensaios de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon);

- Testar os efeitos das frações provenientes de extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras sobre o crescimento de plântulas e de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.);

- Extrair e testar o potencial fitotóxico de frações enriquecidas com saponinas presentes nas folhas, caule e raiz de *Serjania lethalis*.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas jovens e maduras sobre a germinação e o crescimento de *Panicum maximum* e comparar o efeito de cada extrato, apontando qual apresentou maior fitotoxicidade, assim como avaliar quais anormalidades ocorreram nas plântulas submetidas aos efeitos provocados pelos extratos.
2. Avaliar a atividade fitotóxica de frações dos extratos brutos etanólicos e aquosos de folhas jovens e maduras utilizando o bioensaio de coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L.) e assim identificar e caracterizar quais metabólitos secundários estavam presentes nas frações ativas.

3. Testar as frações que apresentaram atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo sobre o crescimento de plântulas e de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.), quando comparados com o efeito provocado pelo herbicida comercial GOAL[®]
4. Testar a atividade fitotóxica de frações enriquecidas com saponinas presentes nas folhas, caule e raiz sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.), extraídas por meio da técnica de Extração em Fase Sólida.
5. Verificar influência da idade do órgão e concluir qual estágio de maturação das folhas apresenta maior fitotoxicidade.

PERGUNTAS DE TRABALHO

- Folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* possuem substâncias inibidoras da germinação e crescimento?
- O efeito causado por frações obtidas de extratos de folhas jovens de *Serjania lethalis* apresentarão maior fitotoxicidade do que frações obtidas por meio de extratos de folhas maduras ?
- É possível que o efeito causado por algumas frações seja semelhante ao provocado pelo herbicida comercial GOAL[®] ?
- Frações obtidas de extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento de plântulas e assim apresentar características de um herbicida natural?
- O desenvolvimento das células xilemáticas pode indicar efeitos inibitórios dos extratos semi-purificados de *S. lethalis*?
- O extrato aquoso de folhas, raízes e caules contendo saponinas apresentarão fitotoxicidade?

Referências Bibliográficas

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Distributional patterns in Brazilian Serjania (Sapindaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.4, n.1, p.69-82, 1990.

- ALVES, S. M.; ARRUDA, M. S. P. e SOUZA FILHO, A. P. S. Biossíntese e Distribuição de Substâncias Alelopáticas. In: Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. 2002. **Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém. 2002.

- BELTRAN CIFUENTES, M. C.; GUTIÉRREZ, E.C.P.; ALVAREZ, J.M.E.; RIOS, J.A.E.; ANGEL, L.S.; MORALES, D. R. Estudio farmacognóstico para el cuidado de la salud a partir de aceites esenciales obtenidos por destilación de arrastre de vapor. **Investigación andina**, v.12, n.20, pp. 8-18, 2010.

- BORGES, F.C.; SANTOS, L.S.; CORRÊA, M.J.C.; OLIVEIRA, M.N.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático de duas neolignanais isoladas de folhas de *Virola surinamensis*(Myristicaceae). **Planta daninha**, v. 25, n.1, pp. 51-59, 2007.

- BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n.1, 2011.

- BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. pp. 29-60. **Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA**. 2002.

- BRAVO, H.R.; IGLESIAS, M. J.; COPAJA, S. V.; ARGANDONA, V. H. **Phytotoxicity of indole alkaloids from cereals**. *Revista latinoamericana de química* 2010, v.38, n.2, pp. 123-129, 2010.

- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, vol.33, n.1, pp. 229-239, 2010.

- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Lavoisier Publishing, pp. 538-544, 1995.

- CANAES, L. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v.29, n.6, pp. 1237-1240, 2006.

- CARNEIRO, A.C.O.; VITAL, B.R.; FREDERICO, P.G.U.; CARVALHO, A.M.M.L.; VIDAURRE, G.B. Propriedades de chapas de aglomerado fabricadas com adesivo tânico de angico -vermelho (*Anadenanthera peregrina*) e uréia- formaldeído. **Revista Árvore**, v.33, n.3, p.521-531, 2009.

- CARAMORI, G. F.; OLIVEIRA, K. T. Aromaticidade: evolução histórica do conceito e critérios quantitativos. **Química Nova**, v.32, n.7, pp. 1871-1884, 2009.

- CHAVES, D.S.A.; COSTA, S.S.; ALMEIDA, P.A., FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R.B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v.33, n.1, pp. 172-180, 2010.

- CHEEK, P.P. Nutritional and physiological properties of saponins: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 51, p. 621, 1971.

- CHAVES, D.S.A. ; COSTA, S.S. ; ALMEIDA, A.P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R.B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n.1, pp. 172-180, 2010.

- CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. Pp. 57-73. In: A.L. Putnam; C.S. Tang (eds.). **The science of allelopathy**. New York, John Wiley & Sons, 1986.

- COPPING, L.G.; DUKE, S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.

- CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Volumes I, II, III, IV, V, VI. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926 – 1978.

- DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

- EINHELLIG, F.A. Interaction involving allelopathy in crop systems. **Agronomy Journal**, v.88, p. 886-893, 1996.

- FERNANDES, G. W.; NEGREIROS, D. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. **Ecological Entomology**, v.26, n.1, p.46–55, 2001.

- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 12, p. 175-204, 2000.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.374-381, 2007.

- GRISI, P.U. **Potencial alelopático de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. 2010. 127p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)- UFSCar São Carlos, 2010.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 311-322, 2011.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C., FORIM, M.R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.

- GUARIM NETO, G. **Flora dos estados de Goiás e Tocantins**. Goiânia: Ed. UFG, 1994. 61p. (coleção Rizzo: *Sapindaceae*).

- GUARIM NETO, G.; SANTANA, S.R. & SILVA, J.V.B. Notas etnobotânicas de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botânica Brasílica**, v.14, n.3, p. 327-334, 2000.

- HARBONE, J.B. Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. **London: Academic**, 1989, v.1.

- HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

- HEGNAUER, W. Chemotaxonomie der Pflanzen, Sapindaceae, **Springer Verlag**, v. 6, p. 271, 1970.

- IBAMA. Relatório técnico do monitoramento do desmatamento no Bioma cerrado, 2002 a 2008. Dados Revisados. 2009, 69 p.

- INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2013. < <http://www.international-allelopathy-society.org/>> (Acesso em 30 de janeiro de 2013).

- KIM, K.U.; SKIN, D.H. La importancia de La alelopatía em La obtención de nuevos cultivares. **Manejo de malezas para países em desarrollo. FAO**, 2004, 300p.

- KIMATA, H; NAKASHIMA, T; KOKUBUM, S; NAKAYAMA, K; MITOMA, Y; KITAHARA, T; YATA, N; TANAKA, O. Saponins of pericarps of *Sapindus mukurossi*

Gaertn. And Solubilization of Monodesmosides of Bisdesmosides. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.6, p.1998-2005, 1983.

- KLINK, C.A.; MACHADO R.B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p 147-155, 2005.

- MALLIK, A. Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. International Allelopathy Society. The Fourth World Congress on Allelopathy was held at Charles Sturt University in Wagga Wagga, NSW, Australia , August 2005. Disponível em <[http:// www.regional.org.au/au/ allelopathy/](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/)>International

- MARTINEZ, M. Las Plantas Medicinales de Mexico. **Editorial Botas**, 1992, p. 472.

- MELKANIA, N. P. Allelopathy in forest and agroecosystems in the himalayan region. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. (Ed.). **Allelopathy: basic and applied aspects**. Chapman & Hall, London. 1992, 480p.

- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000 .

- MURGU, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of Glycosides from *Sapindus saponaria* using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.7, p.1281-1290, 2006.

- OHARA, S.; OHIRA, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. **Journal of Wood Sciences**, v. 49, pp. 59-64, 2003.

- OLIVEIRA, A. J. B.; KOIKE, L. Uma síntese alternativa para o (\pm)-1, 2, 3, 4-tetraidro- $\{9H$ -pirido-[3,4-b]-indol. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.39, n.3, pp. 259-264, 2003.

- PEREIRA, V. C.; GUALTIERI, S.C.J. ; GRISI, P. U. ; ANESE, S ; MIRANDA, M. A. F. M. ; IMATOMI, M. ; RODRIGUES-FILHO, E. . Fitotoxicidade de extratos de folhas jovens de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. sobre o crescimento de Corda-de-viola . **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas na Era da Biotecnologia**, Campo Grande-MS, 2012.

- QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; de NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4, pp. 493-497, 2002.

- REITZ, R., Flora ilustrada catarinense. Sapindáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980, 160p.

- RICE, E.L. **Allelopathy**. 2.ed. New York:Academic, 422p. 1984.

- RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Natural products for pest management. In: Rimando A. M et al. **Natural products for Pest Management**; ACS Symposium Series: American Chemical Society: Washington, 2006.

- SASTRI, B. N. ed. The Wealth of India. **Raw Materials**, v.6, 1962, 80p.

- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da Planta ao medicamento, **Editora Universidade/UFRGS**, 5 ed, 2003, 1102p.

- SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

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

- TEIXEIRA, J. R. M.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R., Timbós: ichthyotoxic plants used by brazilian indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, p. 311–318, 1984.

- TSUZUKI, J.K.; SVISZINSKI, T.I.E.; SHINOBU, C.S.; SILVA, L.F.A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Antifungal activity of the extracts from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, pp. 577-583, 2007.

- TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**, 8. ed. 1981, 67p.

- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, pp. 519-528. 2005.

- VELLOSO, M.A.L; ABREU, I.N; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. **Acta Amazônica**, v. 39, n.2, p.267-272, 2009.

- WALLER, G.R.; FEUG, M.C. & FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. & FOY, C.L. (Eds.) Principles and practices in plant ecology. Boca Raton, CRC Press, 1999. p.75-98.

- WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p.472-479, 2004.

CAPÍTULO I

**Atividade fitotóxica de extratos aquosos de folhas de *Serjania lethalis*
A.St- Hil sobre a germinação e crescimento de *Panicum maximum* Jacq.**

RESUMO- A espécie *Serjania lethalis* A. St- Hil pertence à família Sapindaceae, trata-se de uma liana presente no cerrado brasileiro com conhecidas propriedades ictiotóxicas. Neste trabalho foi investigada a atividade fitotóxica de extratos aquosos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* sobre a germinação e crescimento de *Panicum maximum* Jacq, uma espécie infestante encontrada em culturas de cana- de- açúcar. Foram preparados extratos aquosos nas concentrações de 10; 7,5; 5,0 e 2,5% (p/v) a partir do pó de folhas secas e moídas e água destilada. Para o bioensaio de germinação foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 5 mL de cada extrato em cada concentração e trinta sementes cada. No bioensaio de crescimento foram utilizadas bandejas plásticas transparentes com 8 mL de cada extrato em cada concentração e dez plântulas em cada uma delas. Foram feitas quatro repetições em cada bioensaio e os controles continham água destilada. Os resultados obtidos apontam que a porcentagem e velocidade de germinação, assim como a sincronia, foram afetadas negativamente por ambos os extratos a partir da concentração 5,0%. O crescimento das plântulas também foi afetado negativamente a partir da mesma concentração. Tanto os extratos de folhas jovens quanto os de folhas maduras exibiram fitotoxicidade a partir da concentração 5,0% e provocaram mudanças no crescimento de plântulas. Porém o estágio de maturação foliar não diferiu para a maioria das variáveis analisadas.

Palavras- chave- germinação, crescimento, plântulas, extratos aquosos, fitotoxicidade.

ABSTRACT- The species *Serjania lethalis* A. St- Hil belongs to the family Sapindaceae, it is a liana Brazilian cerrado with known ictiotoxic properties, this work investigated the phytotoxic activity of aqueous extracts of young and mature leaves of *Serjania lethalis* on germination and growth of *Panicum maximum* Jacq, a weed found in cultures of cane sugar. Aqueous extracts were prepared at concentrations of 10, 7.5, 5.0 and 2.5% (w/v) from the leaf powder dried and milled and distilled water. For the germination bioassay were used Petri dishes with diameter of 9 cm containing 5 mL of each extract in each concentration and thirty seeds per replicate. The bioassay of growth were used transparent plastic trays with 8 mL of each extract in each concentration and ten seedlings per replication. It was made four replications in each test and the controls were had distilled water. The results indicate that the percentage and speed of germination, as well as the timing, were negatively affected by both extracts from the 5.0% concentration. The seedling growth was also negatively affected from the same concentration. Both young leaves extracts as extracts of mature leaves exhibited phytotoxicity at concentrations higher than 5.0%, causing changes in the germination and growth of seedlings. But the stage of leaf maturation did not differ for most of the variables.

Key words: germination, growth, seedlings, aqueous extracts, phytotoxicity

1. Introdução

As plantas produzem metabólitos secundários, denominados coletivamente de aleloquímicos (Silva et al., 2011), que estão presentes nas folhas, raiz, caule e frutos (Weir et al., 2004). Tais compostos possuem a função de defesa da planta contra ataques por patógenos e herbivoria (Waller et al., 1999). Porém atualmente tem-se tratado os compostos do metabolismo secundário como promissores herbicidas naturais no controle de plantas daninhas (Grisi et al., 2011; Silva et al., 2011), pois compostos produzidos pelas plantas podem apresentar propriedades fitotóxicas, podendo ser utilizados com sucesso na agricultura (Silva, 2012).

Serjania lethalis A. St- Hil pertence à família Sapindaceae, trata-se de uma liana abundante no cerrado brasileiro, com conhecidas propriedades ictiotóxicas (Teixeira et al., 1984) e fitotóxicas (Pereira et al., 2012 b). Esta espécie ainda é pouco explorada do ponto de vista científico, assim pouco se encontra na literatura sobre suas propriedades farmacêuticas e biológicas. Outra espécie pertencente às Sapindaceas conhecida pelas suas propriedades fitotóxicas é *Sapindus saponaria*, que apresenta propriedades herbicidas no controle de espécies daninhas (Grisi et al., 2012 a)

As plantas daninhas estão entre os principais fatores que limitam o crescimento de espécies cultivadas (Pitelli, 1985; FAO, 2009; Luz et al., 2010) pela competição com estas por fatores que promovem seu crescimento (Dias- Filho, 1998), principalmente espaço, água, luz e nutrientes (Belotto, 1997). Um exemplo é *Panicum maximum* Jacq. (capim-colonião), gramínea forrageira adaptada ao clima tropical e subtropical encontrada principalmente em formações de pastagens (Usberti, 1982) e culturas de cana-de-açúcar (Kuva et al., 2003).

Embora herbicidas sintéticos sejam bastante utilizados no controle de plantas invasoras (Freitas et al., 2004), inclusive no controle de *P. maximum* (Alves et al., 2002),

estes apresentam problemas quando comparados com os herbicidas naturais, principalmente em relação aos impactos causados no ambiente, como contaminação de água e solos (Souza Filho et al., 2006). Assim, sugere-se a necessidade de se estudar e conhecer o potencial fitotóxico de espécies do cerrado, que podem atuar como doadoras de metabólitos secundários e como herbicidas naturais. Com base na carência de informações a respeito do potencial fitotóxico família Sapindaceae e na abundância da espécie *Serjania lethalis* no cerrado, decidiu-se estudar esta espécie a fim de explorá-la como possível fonte de herbicidas naturais.

2. Objetivo

Avaliar o efeito fitotóxico de extratos aquosos de folhas jovens e maduras de *S. lethalis* sobre a germinação e crescimento de *P. maximum*.

3. Material e Metodologia

3.1 Material Vegetal

Folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A. St-Hil foram coletadas em uma área de cerrado *sensu stricto* no município de São Carlos – SP (22°02'S e 47°52'W), em setembro de 2011. Foram consideradas jovens as folhas que apresentaram coloração verde clara e textura membranácea e maduras as folhas com coloração verde escura e textura coriácea (Grisi et al., 2012 b). As folhas foram secas em estufa de circulação forçada a 40°C durante cinco dias e trituradas em moinho industrial. Foi depositado um voucher (8340) no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar).

A espécie alvo, *Panicum maximum*, foi adquirida em comércio local.

3.2 Preparo dos extratos

O extrato aquoso foi preparado a partir de 100 g de material vegetal seco para 1 L de água destilada e deixado em repouso durante 24 h a 4°C. Em seguida foi filtrado a vácuo utilizando-se uma bomba elétrica com funil de Buchner forrado com papel-filtro, segundo recomendações de Gatti et al. (2004). Assim, foi obtido o extrato na concentração 10%. Posteriormente, foram feitas diluições para 7,5; 5,0 e 2,5%. O controle foi feito com água destilada.

3.3 Medidas de pH e Potencial Osmótico

O pH dos extratos de folhas jovens e maduras na concentração 10% foi medido com o peagâmetro Analion e a concentração molar, com o osmômetro automático (μ Osmotte).

3.4 Bioensaio de germinação

Os extratos de folhas jovens e maduras foram aplicados em sementes de *P. maximum* para avaliar o processo germinativo quando comparado com o tratamento controle. Foram utilizadas quatro repetições com 30 sementes cada, distribuídas em placas de Petri de 9 cm com duas folhas de papel-filtro contendo 5 mL de cada extrato nas concentrações 10; 7,5; 5,0 e 2,5% ou controle (água destilada). As placas foram cobertas com PVC a fim de manter a umidade. O experimento foi conduzido em câmara de germinação a 20-30°C e fotoperíodo de 16-8 h (Tomaz et al., 2010). As leituras foram realizadas a cada 24 h, sendo considerada germinada a semente que apresentava protrusão mínima de 2 mm da raiz primária (RAS, 2009).

Também foi realizado um bioensaio para isolar o efeito osmótico do alelopático. Foram utilizadas para o bioensaio de germinação com sementes de *P. maximum* e soluções de polietilenoglicol (PEG) 6000 preparadas de acordo com as especificações de Vilella et al, (1991) a -0,14 e -0,09 MPa, além do controle (água destilada). A metodologia foi a mesma adotada para o bioensaio com os extratos vegetais.

3.5 Bioensaio de crescimento

Para avaliar o crescimento das plântulas de *P. maximum* quando em contato com os extratos, nas diferentes concentrações, as sementes foram pré-germinadas em 8 mL de água destilada. Quando apresentaram 2 mm de radícula foram transferidas para caixas plásticas transparentes (12x8x5 cm) forradas com papel de filtro umedecido com 8 mL de extrato nas mesmas concentrações adotadas no teste de germinação. Foram utilizadas quatro repetições de dez plântulas por tratamento incluindo o grupo controle (água destilada). As caixas foram mantidas durante sete dias em câmara de germinação a 20-30°C e fotoperíodo de 16-8 h (Tomaz et al., 2010). Após este período foram medidos, com

o auxílio de um paquímetro digital, o comprimento da parte aérea e da raiz primária, também foi verificada a porcentagem e o principal tipo de anomalia em cada tratamento (RAS, 2009).

3.6 Cálculos matemáticos

Foram calculadas as seguintes variáveis: porcentagem, velocidade e sincronia do processo germinativo, segundo especificações de Ranal e Santana (2006). Além da porcentagem de plântulas anormais presentes em cada concentração testada.

3.7 Análises estatísticas

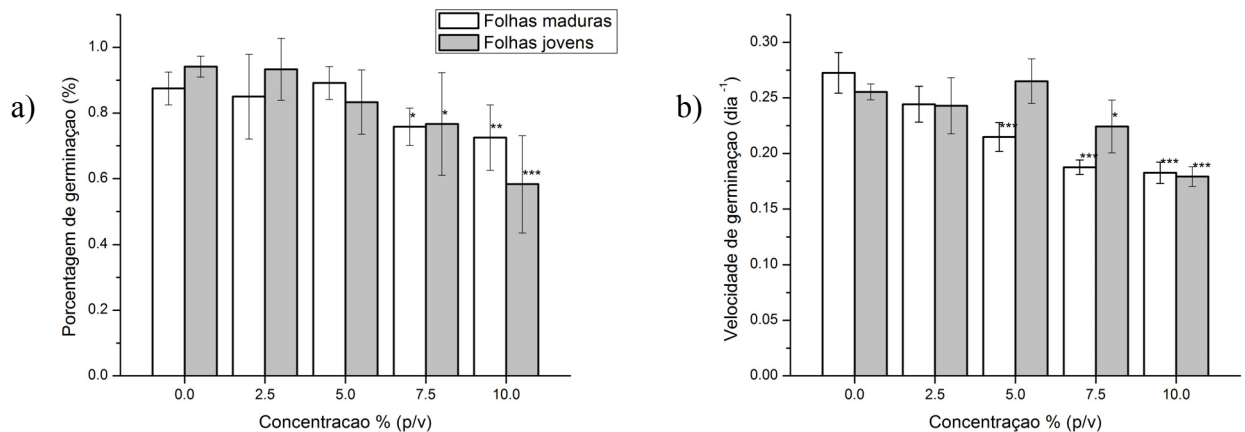
Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados normais e homogêneos foi utilizado ANOVA seguida do teste de Tukey, para dados não normais e não homogêneos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, no programa Past 2.14, para o conjunto das cinco concentrações de cada extrato, sendo que os valores foram antes padronizados para tirar a diferença entre as concentrações (Sokal e Rohlf, 2012). Posteriormente, foi calculado um modelo linear relacionando este parâmetro com as cinco concentrações, o tipo de extrato (folhas jovens ou maduras), e a interação entre estes fatores, por meio da função *lm* no programa R 2.14.0 (R Development Core Team, 2012). As concentrações foram tratadas como variáveis categóricas. O termo de interação indica se o efeito de uma dada concentração difere entre os dois extratos. As significâncias da diferença de cada concentração em relação ao controle, da diferença entre os extratos, e a interação entre a concentração e o tipo de extrato, foram verificadas por um teste t, a um nível de significância de 5%.

4. Resultados e Discussão

4.1 Bioensaio de germinação

Os valores de potencial osmótico (0,1 e 0,09 para folhas jovens e maduras, respectivamente) e pH (6,1 e 6,5 para folhas jovens e maduras, respectivamente) estiveram dentro dos limites de não-interferência no processo germinativo (Souza Filho et al., 1996). A porcentagem, velocidade e sincronia do processo germinativo de sementes que estiveram sob o efeito de soluções de polietilenoglicol (PEG) 6000 a -0,14 e -0,09 MPa não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas com o tratamento controle, desta forma, assumiu-se que todos os resultados obtidos foram devidos aos efeitos provocados pelos extratos.

Os resultados do teste de germinação apontam que os efeitos apresentados pelos extratos aquosos de *S. lethalis* afetaram negativamente o processo de germinação de *P. maximum* nas maiores concentrações. A porcentagem de germinação, para os dois extratos (folhas jovens e maduras), foi inferior ao controle nas concentrações 7,5 e 10% (Figura 1a). A velocidade de germinação foi inferior ao controle nas concentrações de 5,0; 7,5 e 10% na presença do extrato de folhas maduras. O extrato de folhas jovens provocou atraso na velocidade de germinação apenas nas concentrações 7,5 e 10% (Figura 1b). A sincronia do processo germinativo foi alterada negativamente pelo efeito de ambos os extratos a partir da concentração 5,0% (Figura 1c).



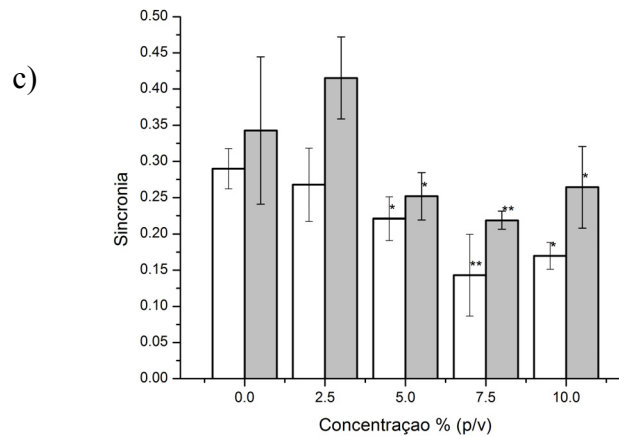


Figura 1. Porcentagem (a), velocidade de germinação (b) e sincronia (c) do processo germinativo de sementes de capim-colonião frente aos extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*. As barras verticais indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam as diferenças significativas entre as concentrações de cada extrato.

O efeito provocado pelo extrato de folhas jovens na concentração 10% foi maior que o efeito provocado pelo extrato de folhas maduras, na porcentagem de germinação.

A velocidade de germinação das sementes não diferiu significativamente perante o efeito provocado por ambos os extratos na concentração 10%. A concentração 7,5% do extrato de folhas maduras provocou atraso na velocidade de germinação maior do que o provocado pelo extrato de folhas jovens, já a concentração de 5% do extrato de folhas jovens, ao contrário do extrato de folhas maduras, não apresentou efeito significativo. A velocidade de germinação, sendo menor na presença dos extratos impede o desenvolvimento normal do embrião, fazendo com que a semente fique disponível no ambiente por mais tempo, aumentando suas chances de predação, além disso, sementes que demoram mais para germinar possuem tamanho reduzido (Jeferson e Pennachio, 2005).

A sincronia do processo germinativo foi afetada de forma negativa por ambos os extratos nas mesmas concentrações, isto fez com que as sementes germinassem em períodos de tempo diferentes, o que, ecologicamente fez com que algumas tivessem maior sucesso de estabelecimento do que outras. O mesmo ocorreu quando extratos aquosos de folhas jovens de *S. lethalis* exerceram atividade fitotóxica sobre a porcentagem e velocidade de germinação da espécie daninha *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sendo este efeito também dependente da concentração testada (Pereira, et al., 2012 a).

4.2 Bioensaio de crescimento

O comprimento total das plântulas de *P. maximum* foi afetado negativamente por ambos os extratos a partir da concentração 5% (Figura 2a). Além disso, os valores médios de comprimento total das plântulas foram maiores na presença de extrato de folhas maduras do que no extrato de folhas jovens. O extrato obtido com o uso de pó de folhas jovens inibiu o crescimento da raiz primária a partir da concentração de 2,5% (Figura 2b) e da parte aérea, a partir das concentrações 7,5 e 10% (Figura 2c). O extrato menos concentrado (2,5%) somente inibiu o crescimento da raiz quando este foi obtido a partir do pó de folhas jovens.

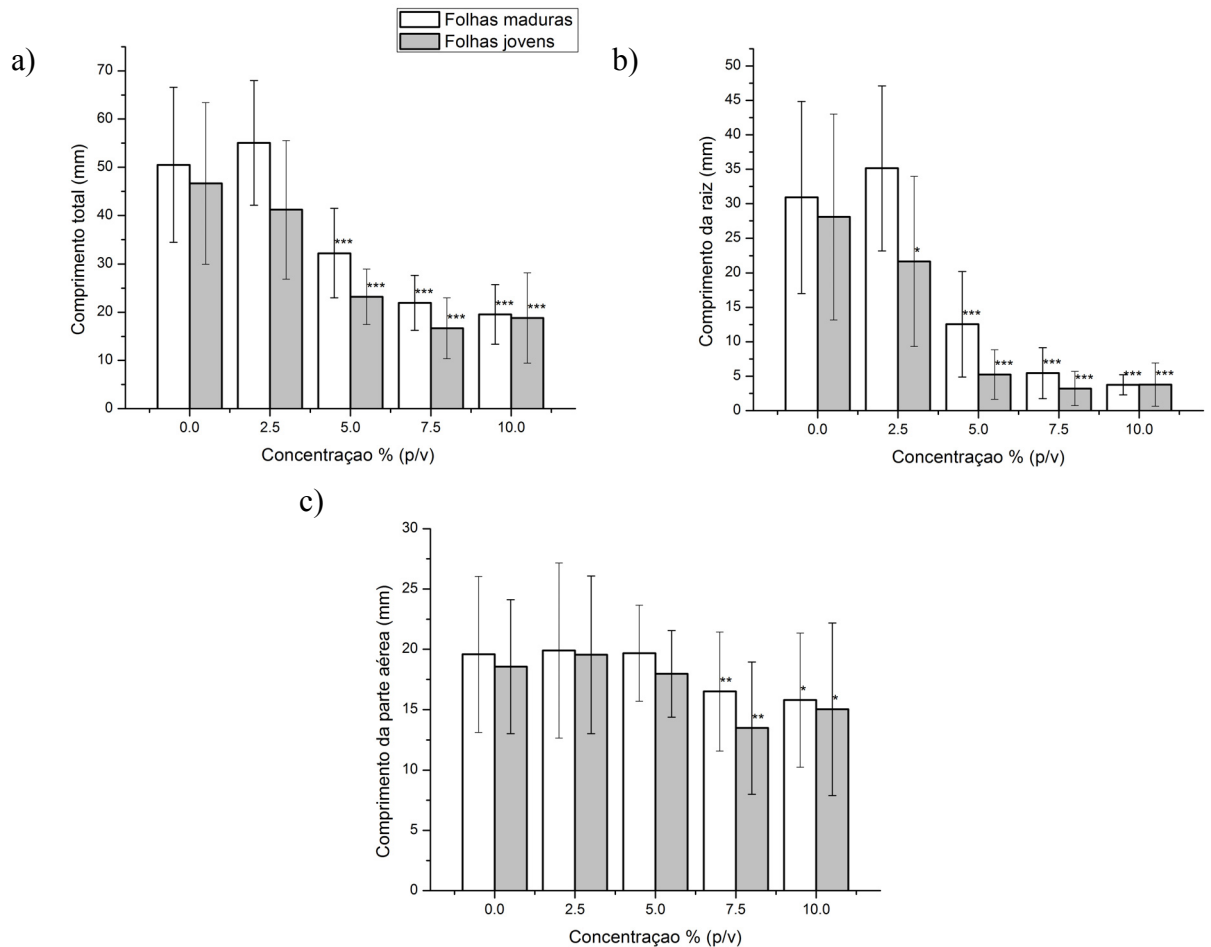


Figura 2. Comprimento total (mm) (a), da raiz (b) e da parte aérea (c) de plântulas de capim-colonião frente aos extratos de *Serjania lethalis*. As barras verticais indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam as diferenças significativas entre as concentrações de cada extrato.

A inibição do crescimento total das plântulas, provocada por ambos os extratos a partir da concentração 7,5%, impede que as mesmas se desenvolvam, diminuindo, desta forma, a colonização desta planta daninha no ambiente. O tamanho reduzido da raiz das plântulas submetidas às concentrações a partir de 5,0% não permite que a mesma absorva os nutrientes do solo e se desenvolva. As raízes são os órgãos mais sensíveis à ação dos extratos (Chon et al., 2000), pois estão em contato direto com os aleloquímicos ali presentes (Chung et al., 2001). A diminuição da parte aérea das plântulas a partir da concentração 7,5% de ambos os extratos diminuiu a área destinada

à realização da fotossíntese pelo vegetal, provocando, assim, insucesso de crescimento e sobrevivência das plântulas.

A tabela 1 apresenta os dados referentes à porcentagem e principal anormalidade presente em cada tratamento, segundo as RAS (2009). As figuras 3 (a e b) ilustram as diferenças provocadas pelos extratos em cada concentração. Tur et al. (2010) encontraram anormalidades em plântulas de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum* submetidas ao extrato aquoso de *Duranta repens*.

Tabela 1. Porcentagem de plântulas anormais e principal anormalidade apresentada em cada tratamento após sete dias em contato com os extratos aquosos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*.

Concentração (%)	Porcentagem de plântulas anormais (%) por tratamento		Principal anormalidade (Folhas jovens/ Folhas maduras)
	Folhas jovens	Folhas maduras	
0,0	7,5	7,5	Raízes seminais curtas
2,5	5,0	7,5	Raízes seminais curtas / Raízes seminais curtas
5,0	20,0	7,5	Raízes seminais e folhas primordiais curtas / Raízes seminais e folhas primordiais curtas
7,5	35,0	20,0	Raízes seminais curtas e fracas, folhas primordiais curtas / Raízes seminais curtas e fracas, folhas primordiais curtas
10,0	37,5	17,5	Raízes seminais curtas e fracas, folhas primordiais curtas / Raízes seminais curtas e fracas, folhas primordiais curtas

O efeito apresentado pelo extrato aquoso de folhas jovens provocou porcentagens de anormalidade nas plântulas superiores às provocadas pelo extrato de folhas maduras,

nas concentrações 5,0; 7,5 e 10%. A partir da concentração 5,0% as plântulas começaram a apresentar, além das raízes seminais curtas, alterações na parte aérea, como folhas primordiais de tamanho reduzido. A anormalidade provocada pelos extratos impedirá que a plântula se desenvolva normalmente, desta forma, o crescimento do vegetal fica comprometido a ponto de não permitir que ele se estabeleça (RAS, 2009).

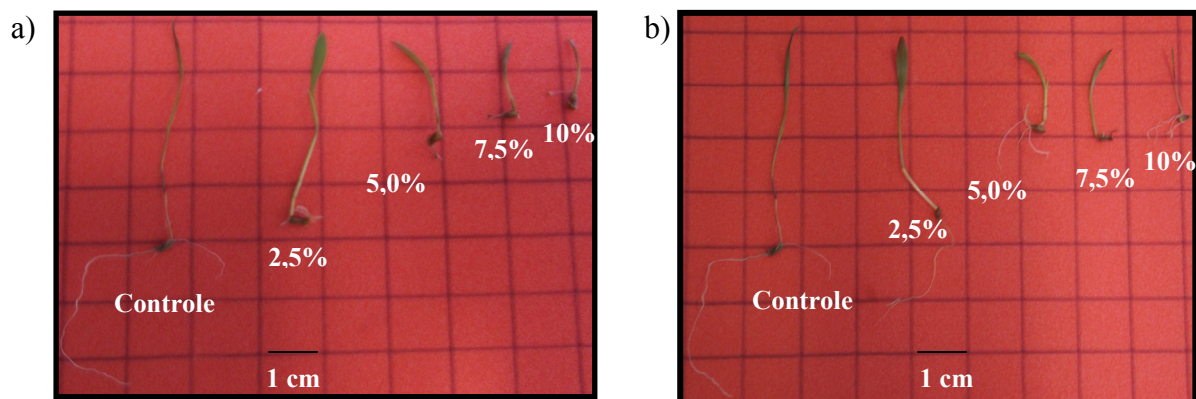


Figura 3. Plântulas de capim- colônia (*Panicum maximum*) crescidas nos tratamentos: controle (água destilada) e extrato aquoso de folhas jovens (a) e maduras (b) nas concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10%. (Foto: Pereira, V.C. 2011).

Dados obtidos em estudos anteriores mostram que extratos aquosos de folhas jovens de *Serjania lethalis* foram responsáveis por causar alterações no crescimento de plântulas de *Ipomoea grandifolia*, sendo as concentrações de 10 e 7,5% as responsáveis pelas maiores alterações (Pereira, et al., 2012 b) e extratos aquosos de raízes e caule de *S. lethalis* foram responsáveis pela atividade inibitória no processo de germinação e no crescimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo, com efeito dependente da concentração (Grisi et al., 2013). Em um estudo desenvolvido com *Sapindus saponaria*, também uma Sapindaceae mostra que extratos aquosos de folhas e caules causaram alterações no crescimento de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), porém os efeitos

foram maiores nas maiores concentrações (7,5 e 10 %) (Grisi et al., 2012 b).

Os aleloquímicos provocam alterações bioquímicas e fisiológicas que afetam negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas (Weir et al., 2004). O mesmo foi verificado neste trabalho, quando observamos os resultados referentes ao tamanho total, tamanho da parte aérea e raiz de *P. maximum*.

Uma explicação possível para as alterações no crescimento das plântulas e parâmetros de germinação é a presença de saponinas nos extratos, trata-se de uma classe de compostos do metabolismo secundário, comuns na família Sapindaceae (Murgu e Rodrigues- Filho, 2006). As saponinas apresentam diversas atividades biológicas, como antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, citotóxica e antiinflamatória (Sparg et al., 2004) e também possuem efeitos reguladores do crescimento de plântulas (Ohara e Ohira, 2003).

5. Conclusões

Com base nos resultados conclui-se que as diferentes concentrações dos extratos de folhas jovens e maduras provocaram mudanças significativas nas variáveis de germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *P. maximum* a partir da concentração 5,0%.

O estágio de maturação das folhas não influenciou no potencial fitotóxico para a maioria das variáveis analisadas.

Referências Bibliográficas

- ALVES, E.; MARTINS, D.; SOUZA, F. H. D. Seletividade de herbicidas pré-emergentes para gramíneas forrageiras tropicais. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 457-464, 2002.

- BELOTTO, E. E. Controle de plantas daninhas em pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1, 1997, Dourados. **Resumos...** Dourados: EMBRAPA. 1997. p. 118-130.

- CHON, S. U.; COUTTS, J. H.; NELSON, C. J. Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 715-720, 2000.

- CHUNG, I. M.; AHN, J. K.; YUN, S. J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, Pullman, v. 20, n. 10, p. 921-928, 2001.

- DIAS FILHO, M. B. Pastagens cultivadas na Amazônia oriental brasileira: processos e causas de degradação e estratégias de recuperação. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: DSO-UFV/SOBRAGE, 1998. p. 135-147.

- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2009. Disponível em <<http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/>>. Acesso em: 21 novembro 2012.

- FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, A. R.; FREITAS, S. J.; SOARES, L. M. S. Controle químico de *Rottboellia exaltata* em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 461-466, 2004.

- GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.
- GRISI, P. U.; GUALTIERI, S. C. J.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 311-322, 2011.
- (a) GRISI, P. U.; RANAL, M. A.; GUALTIERI, S. C. J.; SANTANA, D. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2012.
- (b) GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; PEREIRA, V.C.; ANESE, S.; IMATOMI, M. Phytotoxic activity of *Sapindus saponaria* L. leaf and stem bark on initial growth of *Triticum aestivum* L. **Workshop de Biologia Vegetal**, 2012.
- GRISI, P. U.; GUALTIERI, S. C. J.; ANESE, S.; PEREIRA, V. C., FORIM, M. R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.
- JEFFERSON, L. V.; PENNACHIO, M. Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. **Journal of Arid Environments**, London, v. 55, p. 275-285, 2005.
- KUVA, M. A. ; GRAVENA, R.; PITELLI, R. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ALVES, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana- de-açúcar. III – capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 37-44, 2003.

- LUZ, S. M.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILOHN, G. M. S. P.; VILHENA, K. S. S. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 479-487, 2010.

- MURGU, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 7, p. 1281-1290, 2006.

- OHARA, S.; OHIRA, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. **Journal of Wood Sciences**, Kyoto, v. 49, p. 59-64, 2003.

- (a) PEREIRA, V.C.; GUALTIERI, S.C.J.; GRISI, P.U.; ANESE, S.; MIRANDA, M.A.F.M.; IMATOMI, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Efeito fitotóxico de folhas jovens de *Serjania lethalis* A.St-Hil (Sapindaceae) na germinação de *Ipomoea grandifolia*. **Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. 2012.

- (b) PEREIRA, V.C.; GUALTIERI, S.C.J.; GRISI, P.U.; ANESE, S.; MIRANDA, M.A.F.M.; IMATOMI, M.; RODRIGUES-FILHO, E. F. Fitotoxicidade de extratos de folhas jovens de *Serjania lethalis* sobre o crescimento de Corda-de Viola. **Workshop de Biologia Vegetal**. 2012.

- PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 129, p. 16-27, 1985.

- R DEVELOPEMNT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2012.

- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

- REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES (RAS). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 398p, 2009.

- SILVA, J.; FORTES, A. M. T.; GOMES, F. M.; PINTO, T. T.; BONAMIGO, T.; BOIAGO, N. P. Alelopatia de *Camelina sativa* Boiss. (Brassicaceae) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa* (L.) e *Glycine max* (L.) Merr. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 4, p. 17-24, 2011.

- SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 3, p. 65-74, 2012.

- SOKAL, R. R; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 4 ed. W. H. Freeman and Company, New York, 2012.

- SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Efeitos de extratos aquosos de assapeixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 14, n. 2, p. 93-101, 1996.

- SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

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

- TEIXEIRA, J. R. M.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R., Timbós: ichthyotoxic plants used by brazilian indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, p. 311–318, 1984.

- TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L. R. de; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim-tanzânia. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina v. 32, n. 4, p. 80-87, 2010.

- TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 13-22, 2010.

- USBERTI, R. Teste do envelhecimento acelerado em sementes de capim colômbio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 23-30, 1982.

- VILLELA, F.A., FILHO, L.D.; SIQUEIRA, E.L. Tabela de Potencial Osmótico em Função da Concentração de Polietileno Glicol 6000 e da Temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p. 1957-1968, 1991.

- WALLER, G. R.; FEUG, M. C.; FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT, K. M.; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 75-98.

- WEIR, T.; PARK, S. W.; VIVIANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 7, p. 472-479, 2004.

CAPÍTULO II

**Constituintes químicos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A.
St-Hil sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

RESUMO - A espécie *Serjania lethalis* A. St- Hil pertence à família Sapindaceae. Trata-se de uma liana presente no cerrado brasileiro com conhecidas propriedades ictiotóxicas. Neste trabalho avaliou-se o potencial fitotóxico dos extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A. St.- Hil. (Sapindaceae) sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.). O bioensaio de crescimento dos coleótilos foi feito com as frações provenientes dos extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras. As concentrações testadas foram 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. Foi feito um controle positivo com o herbicida GOAL[®] nas mesmas concentrações e um controle negativo com uma solução tampão, composta por sacarose, ácido cítrico e fosfato de potássio di-básico. As frações que apresentaram fitotoxicidade foram fracionadas utilizando cromatografia líquida de média pressão e as classes de substâncias foram identificadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H) e Espectrometria de Massas (LC-EM). Os resultados indicaram que os extratos etanólicos de folhas jovens exibiram efeito fitotóxico mais pronunciado, inibindo o crescimento dos coleótilos de trigo. Análises das sub-frações levaram à identificação de três procianidinas diméricas e procianidinas poliméricas (taninos condensados), sendo que uma procianidina apresentou dados espectroscópicos não encontrados na literatura.

Palavras-chave: fitotoxicidade, *Serjania lethalis*, procianidinas, taninos

ABSTRACT - The species *Serjania lethalis* A. St- Hil belongs to the family Sapindaceae. It is a liana present in the Brazilian cerrado with known ictiotoxics properties. In this study, it was evaluated the phytotoxic potential of aqueous and ethanol extracts of young and mature leaves of *Serjania lethalis* (Sapindaceae) on the growth of wheat coleoptiles (*Triticum aestivum* L.). The bioassay of the growth of coleoptile was done with the fractions from the aqueous and ethanol extracts of young and mature leaves. The concentrations tested were 0.8, 0.4 and 0.2 mg mL⁻¹. A positive control was done with the herbicide GOAL[®] at the same concentration and a negative control with a buffer solution, composed of sucrose, citric acid and potassium phosphate di-basic. The fractions that showed phytotoxicity were fractionated using liquid chromatography of medium pressure and classes of substances were identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR ¹H) and Mass Spectrometry (LC-MS). The results indicated that the ethanol extracts of young leaves exhibited phytotoxic effect more pronounced, inhibiting the growth of wheat coleoptile. Analysis of the subfractions led to the identification of three dimeric procyanidins and polymeric procyanidins (condensed tannins), and one of the procyanidins presented spectroscopic data that are not found in the literature.

Keywords: Phytotoxicity, *Serjania lethalis*, procyanidins, tannins

1. Introdução

A família Sapindaceae é composta por cerca de 120 gêneros e mais de 1000 espécies amplamente distribuídas em todos os trópicos (Reitz, 1980). As lianas dos gêneros *Serjania* Miller e *Paullinia* L. e as árvores de grande porte dos gêneros *Talisia* Aublet e *Cupania* L. representam algumas formas de vida que ocorrem nesta família (Guarim Neto, 1994). O gênero *Serjania* engloba cerca de 226 espécies, sendo seu maior centro de ocorrência o sul do México com 48 espécies, seguido pelo Brasil com a ocorrência de 35, encontradas no planalto central e costa Atlântica (Acevedo-Rodríguez, 1990). *Serjania lethalis* A. St-Hil é uma espécie invasora do cerrado brasileiro. Estudos fitoquímicos mostram que espécies da família Sapindaceae são produtoras de isoprenóides e polifenóis (Hegnauer, 1970).

As plantas possuem compostos orgânicos que são utilizados para sua defesa contra patógenos, competidores e predadores, os quais fazem parte do metabolismo secundário (Croteau et al., 2000). Estes compostos podem ser utilizados como herbicidas naturais, uma vez que inibem o crescimento de outras plantas, atuando em nível celular (Grisi et al., 2013) e provocando alterações bioquímicas e fisiológicas que afetarão negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas (Weir et al., 2004). Além disso, os produtos naturais apresentam vantagens em relação aos herbicidas sintéticos, pois não causam danos ao meio ambiente (Souza-Filho et al., 2006), muitos não apresentam moléculas halogenadas, e possuem meia vida menor (Duke et al., 2000; Rimando e Duke, 2006).

Uma das formas de avaliação do potencial fitotóxico dos produtos do metabolismo secundário vegetal é feita por meio do crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Esta metodologia foi inicialmente proposta por Hancock et al (1964) e atualmente tem sido uma ferramenta muito utilizada pois é capaz de avaliar o

estímulo ou inibição do crescimento dos coleóptilos quando em contato com os agentes fitotóxicos.

A fase de maturação em que o vegetal se encontra proporciona o acúmulo de componentes químicos diferentes. Folhas jovens sofrem alta pressão de herbivoria, produzindo maior variedade de componentes químicos para defesa (Lokvam e Kursar, 2005). Com base na constatação de que muitas espécies defendem seus estágios de desenvolvimento juvenis metabolicamente (Bryant e Julkunen-Tiitto, 1995), pode-se supor que há uma concentração maior de aleloquímicos em folhas jovens do que em folhas maduras. Durante a senescência os nutrientes presentes nas folhas são realocados para desenvolver órgãos ou tecidos de reserva (Gan e Amasino, 1997), podendo levar à baixa concentração de compostos fitotóxicos, resultando na baixa taxa de inibição causada por extratos originados dessas folhas.

Com base nestas informações decidiu-se realizar um estudo fitoquímico de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*, a fim de isolar e identificar as substâncias responsáveis por esta atividade, uma vez que a literatura carece de informações sobre a fitotoxicidade desta espécie.

2. Objetivos

Avaliar o potencial fitotóxico de frações de extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*)

Isolar e identificar os compostos presentes nas frações ativas.

3. Material e Metodologia

3.1 Material vegetal

Folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A.St- Hil foram coletadas de pelo menos dez indivíduos diferentes, na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). Foram consideradas jovens as folhas que apresentaram textura membranácea e coloração verde clara, as folhas maduras apresentaram textura coriácea e coloração verde escura (Grisi et al., 2011). O material vegetal foi seco em estufa de circulação a 40 °C durante 72h e em seguida triturado em moinho elétrico e armazenados em sacos plásticos devidamente lacrados. Foi depositado um voucher (8340) no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar).

3.2 Extração e isolamento

Foram preparados extratos aquosos e etanólicos com o pó das folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*, utilizando – se 1L de água destilada e 100g de pó de folhas jovens ou maduras. Os extratos permaneceram durante 24h em geladeira a 4°C, foram filtrados a vácuo, congelados a -70°C e liofilizados. Os extratos etanólicos passaram pelo mesmo procedimento, porém a extração foi feita utilizando-se etanol e após a filtragem os extratos foram secos em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

Os extratos etanólicos dos dois tipos de folhas foram fracionados através de cromatografia de coluna com sílica gel de fase normal (0.063-0.2 mm / 70-230 mesh). Inicialmente foram utilizados 10g do extrato seco (Figura 1) e 450 mL dos eluentes na seguinte ordem: hexano: acetona (7:3); hexano: acetona (3:7); acetona (1); acetona: metanol (7:3); acetona: metanol (3:7); metanol (1); metanol: água (9:1). Os extratos

aquosos também passaram pelo mesmo processo, porém com os eluentes: acetona (1); acetona: metanol (7:3); acetona: metanol (3:7); metanol (1); metanol: água (9:1) (Figura 2). Após a separação cromatográfica as frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD), e reunidas de acordo com a similaridade química.

As frações que apresentaram potencial fitotóxico sobre o crescimento dos coleótilos de trigo foram separadas em sub-frações utilizando o cromatógrafo de média pressão TELEDYNE ISCO Combiflash[®] Rf 200 com os eluentes metanol: água, (7:3) e 0,1% de ácido fórmico. A fração **Fme1** apresentou-se muito apolar e foi fracionada por meio de cromatografia de coluna com sílica de fase normal com os eluentes hexano: acetato de etila nas proporções 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1(Figura 2). Observou-se em CCD que algumas sub-frações (**Fje3C e Fje3D**) estavam semi-purificadas (Figura 3), assim foi feita cromatografia de exclusão molecular utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e os eluentes metanol: água (7:3). As substâncias isoladas foram identificadas por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H) e Espectrometria de Massas (LC-MS).



Figura 1. Coluna cromatográfica utilizada para o fracionamento dos extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* (Foto: Pereira, V.C. 2012)

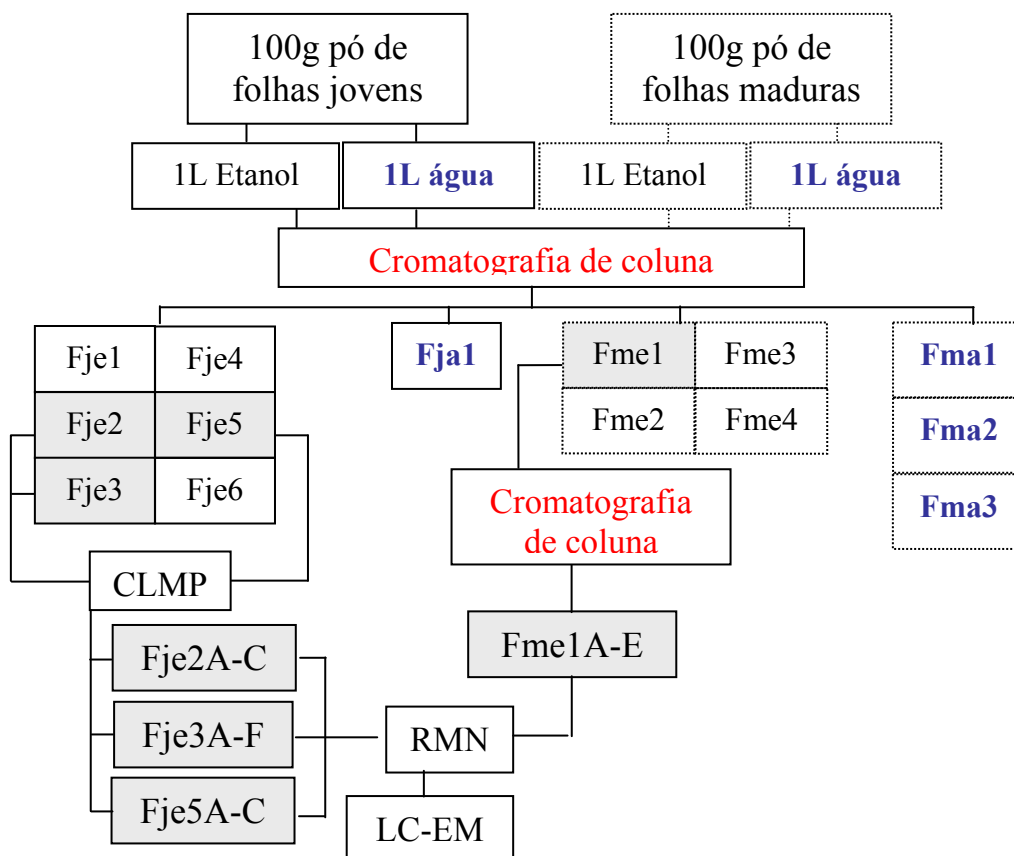


Figura 2. Fluxograma do processo de extração e isolamento de substâncias fitotóxicas presentes em folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*. Folhas jovens extraídas com etanol (je), folhas maduras extraídas com etanol (me), folhas jovens extraídas com água (ja), folhas maduras extraídas com água (ma). Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Espectrometria de Massas (LC-EM), Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP).

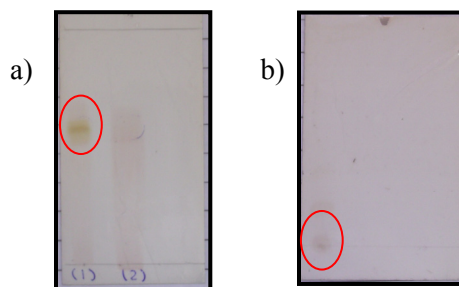


Figura 3. Cromatografias de camada delgada (CCD) das sub-frações **Fje3C** (a) e **Fje3D** (b) com substâncias purificadas. (Foto: Pereira, V.C. 2012)

3.3 Atividade fitotóxica das frações sobre coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

A avaliação da atividade fitotóxica foi feita mediante o bioensaio de coleótilo de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon). Para tanto, cariopses de trigo foram pré-germinadas em água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25°C durante 4 dias em ausência de luz, como estabelecido por Hancock et al. (1964). Posteriormente, sob luz verde (Nitsch e Nitsch, 1956), para evitar a estagnação do crescimento das células, os coleótilos foram selecionados e cortados com uma guilhotina de Van der Weij. Os ápices dos coleótilos foram descartados, enquanto o restante foi cortado em 4 mm e colocados em tubos de ensaio contendo solução tampão (pH de 5.6) composta por sacarose (20 g/L), ácido cítrico monohidratado (1.05 g/L) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2.9 g/L).

Em cada tubo foram adicionados 2 mL das respectivas soluções nas concentrações de 0,8, 0,4 ou 0,2 mg. mL⁻¹ e cinco coleótilos. Como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial GOAL[®] (240 g.i.a. L⁻¹) nas mesmas concentrações que as frações e, como controle negativo foi utilizada a solução tampão com DMSO. Esses tubos, distribuídos aleatoriamente, foram mantidos a 25 °C no escuro, sob rotação constante de 6 r.p.m., sendo utilizadas três repetições por tratamento (Macías et al. 2010). Após 24 horas, os coleótilos foram retirados dos tubos, fotografados e medidos com auxílio do programa de digitalização de imagens (ImageJ.).

Os dados foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, onde o “zero” referencia o controle, enquanto os valores positivos indicam no estímulo da característica analisada, e os negativos na inibição.

3.4 Análises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados normais e homogêneos foi utilizado ANOVA seguida do teste de Tukey .

3.5 Identificação

Para a identificação das substâncias foram utilizados um espectrômetro de BRUKER DRX-400 operando a 9.4 Tesla e um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo QuattroLC –MICROMASS equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*.

4. Resultados e Discussão

4.1 Rendimento

Foi calculado o rendimento (em g) de cada fração obtida por meio do fracionamento em cromatografia de coluna, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Massa obtida de cada fração de extrato aquoso e etanólico de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*

Fração	Massa obtida (g)
Fje1	0,47
Fje2	0,68
Fje3	2,80
Fje4	0,97
Fje5	1,18
Fje6	0,35
Fja1	2,92
Fme1	0,80
Fme2	0,10
Fme3	0,32
Fme4	4,00
Fma1	2,14
Fma2	0,38
Fma3	0,73

4.2 Atividade fitotóxica das frações sobre coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Foram consideradas fitotóxicas as frações que atuaram negativamente sobre o crescimento de coleótilos de trigo em pelo menos duas concentrações (0,8 e 0,4 mg .mL⁻¹). A fração **Fje2** inibiu significativamente o crescimento dos coleótilos nas concentrações 0,8 (-84,7%); 0,4 (-76,1%) e 0,2 mg. mL⁻¹ (-60,7%) (Figura 4). A fração **Fje3** também promoveu a redução do crescimento dos coleótilos nas concentrações 0,8 mg. mL⁻¹ (-67,9%); 0,4 mg. mL⁻¹ (-69,0%) e 0,2 mg. mL⁻¹ (-53,0%) (Figura 4). A

fração **Fje5** inibiu o crescimento nas concentrações 0,8 (-83,3%) e 0,4 mg. mL⁻¹ (-66,4%); a fração **Fme1** foi responsável pela redução do crescimento dos coleóptilos apenas nas concentrações 0,8 (-74,2%) e 0,4 mg. mL⁻¹ (-73,6%) (Figura 4). O herbicida GOAL[®] (240 g.i.a. L⁻¹) inibiu o crescimento dos coleóptilos em valores superiores a 90,0%. As demais frações **Fje1**, **Fje4**, **Fje6**, **Fme2**, **Fme3**, **Fme4**, **Fja1**, **Fma1**, **Fma2** e **Fma3** não apresentaram potencial fitotóxico. Dessa forma, as sub-frações **Fje2** e **Fje3** foram submetidas a novos fracionamentos para a identificação dos compostos responsáveis pela atividade inibitória.

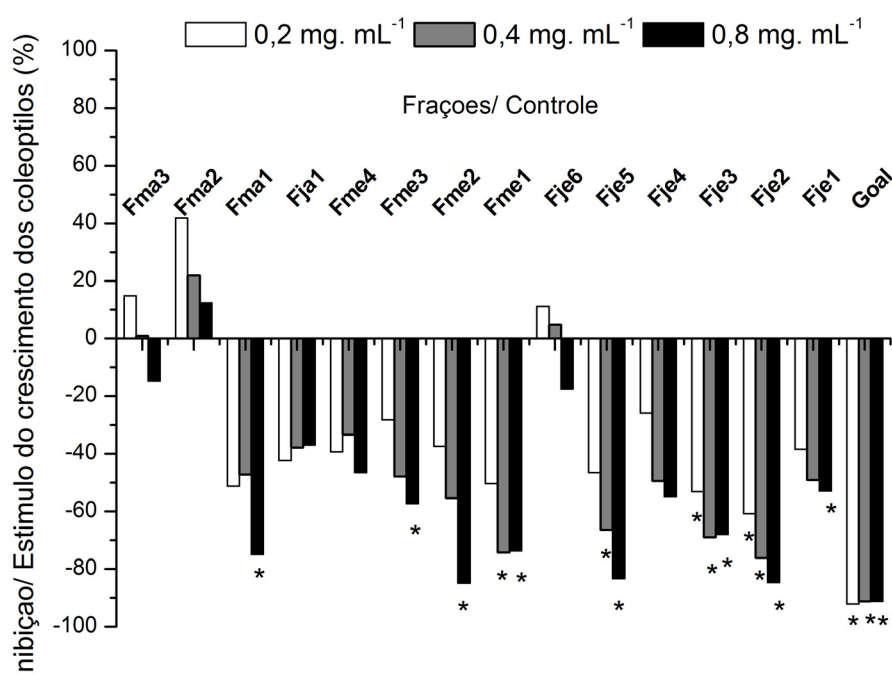


Figura 4. Efeito das frações etanólicas de folhas jovens (Fje1 a Fje6) e folhas maduras (Fme1 a Fme4); frações aquosas de folhas jovens (Fja1) e folhas maduras (Fma1 a Fma3) de *Serjania lethalis* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indicam as frações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL[®].

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como os diferentes órgãos vegetais, são de considerável importância e podem influenciar a quantidade total de metabólitos produzidos (Batish et al., 2007; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Em estudo realizado com folhas jovens de *Palouwnia tomentosa* (Thunb.) Steud., verificou-se que a densidade de tricomas contendo flavonóides é maior do que em folhas maduras (Kobayashi et al., 2008). O maior efeito inibitório das folhas jovens com relação às folhas maduras também foi relatado por outros autores (Marchi et al., 2008; Nascimento et al., 2007; Grisi et al. 2012). Eles concluíram que tecidos mais velhos, por possuírem maior produção de biomassa, nem sempre exercem efeito fitotóxico sobre as espécies circundantes, apresentando, assim, baixa concentração de aleloquímicos. Desta forma, os resultados mostram que o estágio de maturação da folha de *Serjania lethalis* interfere nas suas propriedades fitotóxicas e sugerem que a busca de novas substâncias com propriedade reguladora do crescimento de plantas pode ser mais promissora se forem realizadas em tecidos mais jovens, ou melhor, em tecidos cujo metabolismo secundário seja mais intenso. As análises por LC-EM indicaram que a sub-fração de **Fje2**, **Fje2A**, é composta por duas procianidinas epiméricas (m/z 559) (Figura 5). Os seus dados de RMN¹H mostraram que essas duas procianidinas contém, ao menos, uma unidade formada pelo flavonóide Kaempferol, devido à presença dos dois pares de dubletos intensos em δ 7.75 e 6.89. A presença da unidade kaempferol é também evidente pelas absorções no UV em 271 e 340 nm (benzoila e cinamoila, respectivamente). Não foram encontrados relatos de substâncias com essas características espectroscópicas na literatura. O radical R não foi determinado até o momento.

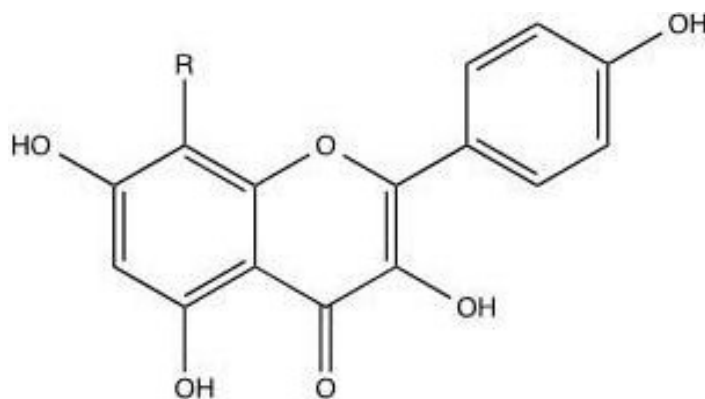


Figura 5. Procianidinas epiméricas presentes na sub-fração **Fje2A**.

A fração **Fje2B** mostra nos seus espectros de RMN um conjunto de multipletos para hidrogênios dispostos em um anel aromático 1,3,5-trissubstituído (δ 7.72, dd; δ 7.56, d; e δ 7.2 d) como observado para a catequina, e também um conjunto de três singletos em torno de δ 6.7. Os dados de LC-UV-MS também indicaram que **Fje2B** contém dois epímeros (Figura 6). Seus espectros de absorção no UV mostram apenas uma fraca absorção em 279 nm como a absorção mais batocrômica. Os espectros de EM dos dois epímeros são idênticos e contém $[M-H]^-$ em m/z 575, que fragmentam em MS/MS pra produzir espectros contendo íons em m/z 449 (40%), 423 (48%), 289 (68%) e 285 (100%). Assim, em conjunto com os dados de RMN mostrados acima, esses fragmentos iônicos mostraram que os dois epímeros tratam de procianidinas diméricas tipo-A (Poupard et al., 2011).

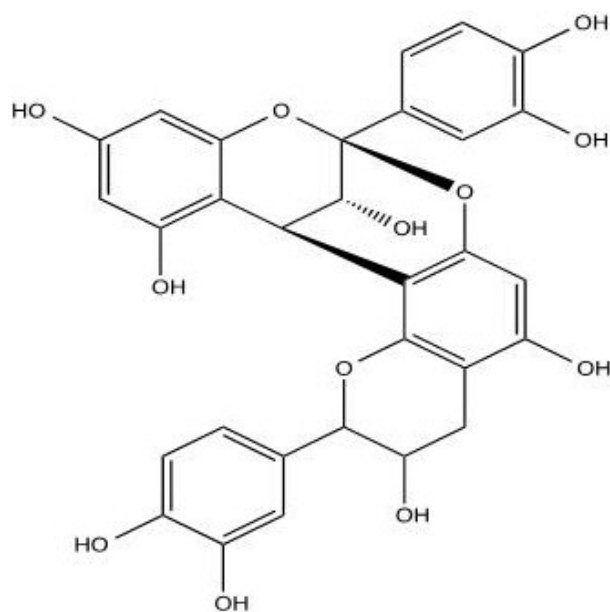
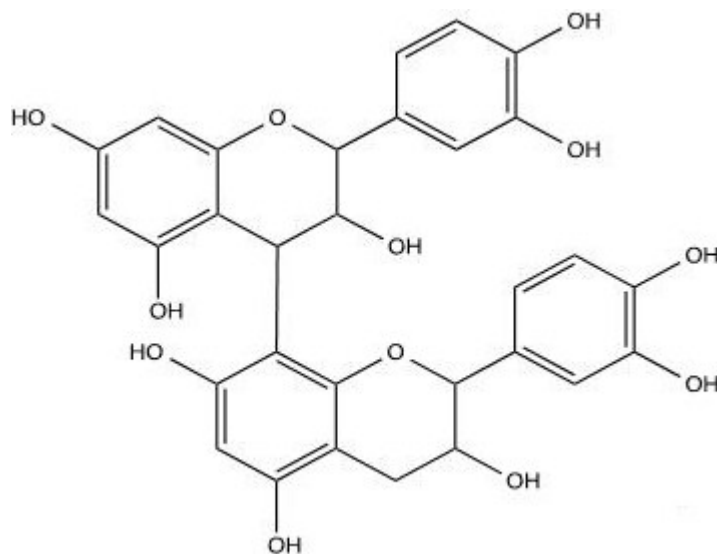
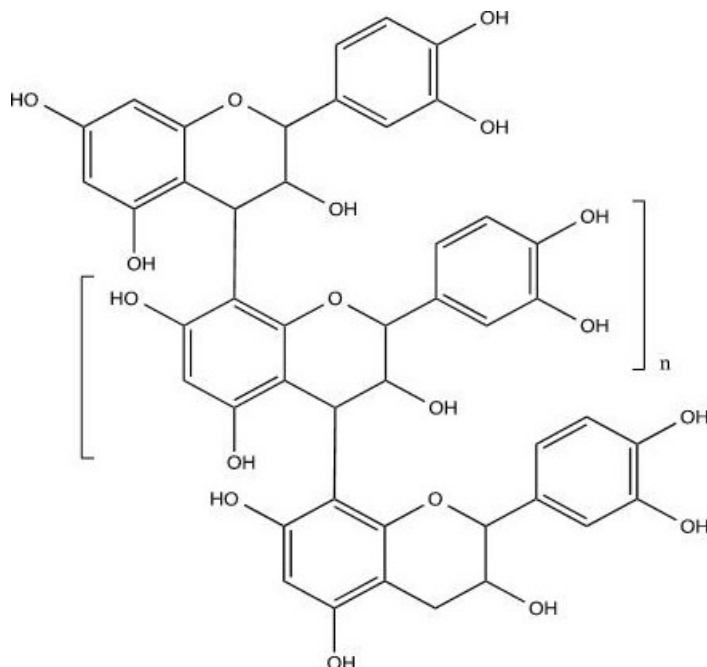


Figura 6. Procianidinas diméricas tipo-A presentes na sub-fração **Fje2B**

A fração **Fje2C** também apresentou sinais no espectro de RMN para o sistema catecólico no anel B da unidade flavonoídica (δ 7.72, dd; δ 7.56, d; e δ 7.2 d), mas também contém sinais na região mais blindada os quais são característicos de sistemas ABX, típicos para os anéis C de proantocianidinas (2.1, dd; 2.6 dd; 2.84, dd; 3.82 d; 4.19 d, 4.36 d) (Figura 7). As análises por LC-UV-MS mostraram que nessa fração há uma pequena quantidade do dímero identificado em **Fje2B**, mas contém como componente principal a procianidina dímero tipo-B (Poupard et al., 2011).

Figura 7. Procianidina dímero tipo-B presente na sub-fração **Fje2C**

A fração **Fje3A** contém uma mistura de catequinas oligoméricas (taninos condensados) (Figura 8). Os dados de EM permitiram detectar as procianidinas discutidas acima na forma polimérica através da detecção dos íons em torno de m/z 579, 864 e 1153.

Figura 8. Catequinas oligoméricas (taninos condensados) presentes na sub-fração **Fje3A**

Os taninos e derivados das catequinas encontrados neste trabalho foram isolados de frações que apresentaram atividade fitotóxica sobre os coleótilos de trigo. Desta forma, por estarem presentes nestas frações sugere-se que são capazes de interferir negativamente sobre o crescimento de espécies vegetais. Diversas pesquisas tem apontado que este tipo de atividade é provocada por estes grupos. A fitotoxina - (-) catequina foi responsável por desencadear uma onda de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando aplicadas sobre raízes de *Arabidopsis thaliana* (Bais et al., 2003), já a (+) – catequina apresentou atividade antibacteriana e contra patógenos de raízes infestantes (Bais et al., 2002). Rice (1984) apontou quatorze categorias de compostos químicos que interferiram no crescimento de espécies vegetais, dentre eles os taninos e os fenóis.

A substância identificada na fração **Fje2A** não se assemelha com outras registradas na literatura, assim, foi identificada uma nova substância presente em folhas jovens de *Serjania lethalis* ainda não descrita e também sem qualquer tipo de registro para esta espécie. Tal substância, composta por duas procianidinas epiméricas, esteve presente em uma fração que apresentou atividade fitotóxica para o crescimento de coleótilos de trigo, sugerindo que esta possa apresentar fitotoxicidade.

As substâncias presentes nas sub-frações de **Fje5** e **Fme1** apresentam alta complexidade espectroscópica e ainda estão sendo elucidadas.

Este trabalho contribuiu para o conhecimento do potencial fitotóxico de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* (Sapindaceae), uma vez que foram isoladas e identificadas quatro compostos presentes em folhas jovens, sendo um deles ainda não descrito na literatura (procianidinas epiméricas). E ainda contribui para a quimiotaxonomia desta espécie, já que não há registros do perfil químico de *Serjania lethalis* na literatura.

5. Conclusões

Frações obtidas de extratos etanólicos de folhas jovens de *Serjania lethalis* apresentaram-se mais potentes na redução do crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) do que frações provenientes de extratos de folhas maduras.

Das sub-frações de extratos etanólicos de folhas jovens foram isoladas e identificadas três procianidinas diméricas e procianidinas poliméricas, sendo que uma procianidina apresentou dados espectroscópicos não encontrados na literatura.

Referências bibliográficas

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Distributional patterns in Brazilian *Serjania* (Sapindaceae). **Acta Botanica. Brasilica**, v.4, n.1, p.69-82, 1990.

- BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; STERMITZ, F.R.; HUFBAUER, R.A.; VIVANCO, J.M. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin; a rhizosecreted racemic mixture from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Plant Physiology**, v. 128, p.1173-1179, 2002.

- BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. **Science**, v.301, n.5. p.1377 - 1380, 2003.

- BATISH, D.; LAVANYA, K.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. **Plant Growth Regulation**, v. 51, p. 119–128, 2007.

- BRYANT, J.P.; R. JULKUNEN-TIITTO. Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 883-895, 1995.

- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000.

- DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

- GAN, S.; AMASINO, R.M. Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 113, p. 313-319, 1997.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, São Paulo, 2007.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 311-322, 2011.

- GRISI, P.U.; RANAL, M.A.; GUALTIERI, S.C.J.; SANTANA, D.G. (2012) Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. **Acta Scientiarum Agronomica**, v.34, p.1-9, 2012.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C., FORIM, M.R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.

- GUARIM NETO, G. **Flora dos estados de Goiás e Tocantins**. Goiânia: Ed. UFG, 1994. 61p. (coleção Rizzo: *Sapindaceae*).

- HANCOCK, C.R.; BARLOW, H.W.; LACEY, H.J. The East Malling Coleoptile Straight Growth Test Method. **Experimental Botany**, v.15, n.1, pp.166- 176, 1964.

- HEGNAUER, W. Chemotaxonomie der Pflanzen, Sapindaceae, **Springer Verlag**, v. 6, p. 271, 1970 .

- KOBAYASHI, S.; ASAI, T.; FUJIMOTO, Y.; KOHSHIMA, S. Anti-herbivore Structures of *Paulownia tomentosa*: Morphology, Distribution, Chemical Constituents and Changes During Shoot and Leaf Development. **Annals of Botany**, v. 101, n. 7, p. 1035-1047, 2008.

- LOKVAN, J.; KURSAR, T.A. Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 2563-2580, 2005.

- MACÍAS, F.A.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J.M.G. Isolation and Phytotoxicity of Terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, pp. 396-404, 2010.

- MARCHI, G.; MARCHI, E.C.S.; WANG, G.; MCGIFFEN, M. Effect of age of a Sorghum-sudangrass hybrid on its allelopathic action. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 707-716, 2008.

- NASCIMENTO, M. C.; ALCANTARA, S. F.; HADDAD, C. R. B.; MARTINS, F. R. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. **Allelopathy Journal**, v.20, n.2, p. 279-286, 2007.

- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Studies on the growth coleoptile and first internode sections. A new sensitive straight- growth test for auxins. **Plant physiology**, v. 31, pp. 94-111, 1956.

- POUPARD, P.; SANONER, P.; BARON, A.; RENARD, C.M.G.C.; GUYOT, S. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n.11, pp. 1186-1197 , 2011.

- REITZ, R., Flora ilustrada catarinense. Sapindáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980, 160p.

- RICE, E.L. **Allelopathy**. 2.ed. New York:Academic, 422p. 1984.

- RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Natural products for pest management. In: Rimando A. M et al. **Natural products for Pest Management**; ACS Symposium Series: American Chemical Society: Washington, 2006.

- SOUZA FILHO, A. P. S. ; SANTOS, R.A., SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

- WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p.472-479, 2004.

CAPÍTULO III

Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* A. St- Hil sobre o crescimento de plântulas e células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

RESUMO - O estudo do potencial fitotóxico de plantas do cerrado tem levado ao isolamento de substâncias capazes de controlar o crescimento de outras espécies vegetais. Neste trabalho buscou-se testar frações de extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A. St- Hil (Sapindaceae) sobre o crescimento de plântulas e células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Foram preparados extratos brutos etanólicos e aquosos a partir do pó de folhas jovens e maduras de *S. lethalis*. Os extratos foram secos e fracionados por meio da técnica de cromatografia de coluna. Para o bioensaio de crescimento de plântulas foram utilizadas sementes de gergelim pré-germinadas, colocadas em caixas plásticas transparentes com 13 mL de solução de cada fração nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. O controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL[®] nas mesmas concentrações e o controle negativo foi feito com água destilada com DMSO (5%). As caixas foram colocadas em sacos plásticos transparentes e mantidas em câmara de germinação a 28°C com fotoperíodo de 12 h. Após sete dias foram medidos o comprimento da parte aérea e da raiz primária com o auxílio de um paquímetro digital. O bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim foi feito com plântulas crescidas em soluções contendo as frações nas mesmas concentrações. Posteriormente a raiz primária das plântulas foi retirada e fixada em álcool 70% e após sete dias foi clarificada com NaOH e corada. Após esse procedimento as raízes foram colocadas em lâminas de vidro e fotografadas. Os resultados apontam que as frações testadas (**Fje2**; **Fje3**; **Fje5** e **Fme1**) apresentaram atividade inibitória do crescimento das plântulas, interferindo principalmente no crescimento das raízes. A fração **Fje5** apresentou atividade semelhante à causada pelo herbicida GOAL[®] utilizado como controle positivo. Essa mesma fração foi responsável por causar a maior inibição do crescimento das células do metaxilema de gergelim na concentração 0,8 mg. mL⁻¹. Isso leva a crer que nessa fração estão presentes compostos com grande potencial fitotóxico. A partir da análise dos resultados foi possível concluir que frações provenientes do

extrato etanólico de folhas jovens são promissoras fontes de substâncias com propriedades fitotóxicas.

Palavras-chave: Fitotoxicidade, plântulas, metaxilema, *Serjania lethalis*

ABSTRACT - The study of phytotoxic potential of cerrado plants has led to the isolation of substances capable of controlling the growth of other plant species, making possible the study of the use of these plants as a source of substances with phytotoxic properties. In this study it was intended to test fractions of aqueous and ethanol extracts of young and mature leaves of *Serjania lethalis* A. St- Hil (Sapindaceae) on the growth of seedlings and metaxylem cells of sesame (*Sesamum indicum*) . Crude extracts ethanolic and aqueous were prepared from the powder of young and mature leaves of *S. lethalis*. They were dried and fractionated through the technique of column chromatography. For the bioassay for growth of seedlings were used pre-germinated sesame seeds, placed in transparent plastic boxes with 13 mL of solution at concentrations of 0.8, 0.4 and 0.2 mg mL⁻¹. The positive control was done with the commercial herbicide GOAL[®] at the same concentrations and the negative control was made with distilled water with DMSO (5%). The boxes were placed in transparent plastic bags and kept in a growth chamber at 28°C with a photoperiod of 12 hours. After seven days the length of the aerial part and the primary root were measured with the aid of a digital pachymeter. The bioassay of metaxylem sesame cell growth was done using seedlings grown in solutions containing the fractions at the same concentrations. Subsequently the primary root was removed and fixed in 70% alcohol and, after seven days, it was clarified with NaOH and stained. After this procedure the roots were plated and photographed. The results point that the fractions tested (**Fye2**; **Fye3**; **Fye5** e **Fme1**) showed inhibitory activity of seedling growth, interfering mainly in root growth. The fractions **Fye5** showed similar activity to the one caused by the herbicide GOAL[®]. This same fraction was responsible for causing the greatest inhibition of cell growth of metaxylem sesame at the concentration 0.8 mg mL⁻¹. This suggests that in this fraction are present compounds with great phytotoxic potential. From the analysis of the results it was possible to conclude that fractions from the ethanol extract of young leaves are promising sources of substances with phytotoxic properties.

Keywords: Phytotoxicity, seedling, metaxylem, *Serjania lethalis*

1. Introdução

A alelopatia é um fenômeno ecológico que envolve a liberação de produtos do metabolismo secundário de plantas, algas, bactérias ou fungos. Estes metabólitos podem exercer efeitos positivos ou negativos sobre sistemas naturais ou agrícolas (International Allelopathy Society, 2012)

Os compostos do metabolismo vegetal também conhecidos como aleloquímicos pertencem a diversas classes de substâncias químicas, como quinonas, fenóis, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos e alcalóides (Rice, 1984), também apresentam atividade antifúngica como as saponinas isoladas de *Sapindus saponaria* (Tsuzuki et al., 2007), moluscicida (Pires, 2008), antioxidante (Oliveira et al., 2007), fitotóxica (Grisi et al., 2013; Kim et al., 2005), antiparasítica (Traore et al., 2000), dentre outras.

Atualmente muitos trabalhos comprovam a atividade fitotóxica de extratos de plantas sobre a germinação e crescimento de outras espécies (Grisi et al., 2012; Gatti et al., 2010; Imatomi, 2010; Alves et al., 2004), outros trabalhos como os de Grisi et al. (2011) vão além e sugerem o uso destes extratos como herbicidas naturais, pois afetam negativamente a germinação e crescimento de espécies de plantas daninhas. Estes aleloquímicos provocam alterações bioquímicas e fisiológicas que afetarão negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas (Weir et al., 2004). Os herbicidas originados de plantas, também conhecidos como herbicidas naturais, apresentam vantagens quando comparados com os herbicidas sintéticos, pois são menos nocivos ao meio ambiente (Souza-Filho et al., 2006), além de possuírem meia vida menor (Duke et al., 2000; Rimando e Duke, 2006). Inderjit e Dakshini (1995) consideram de grande importância os bioensaios para testar a atividade dos metabólitos

secundários vegetais pois são através deles que podemos conhecer a suscetibilidade de determinadas espécies perante os aleloquímicos, e assim conhecer o potencial fitotóxico da espécie estudada.

Serjania lethalis A. St- Hil. pertence à família Sapindaceae, trata-se de uma liana tipicamente encontrada no cerrado brasileiro (Fernandes e Negreiros, 2001), também ocorre nos estados da Bahia, Amazonas, Ceará, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina, além dos países Bolívia e Peru (Acevedo-Rodriguez, 1990). A espécie *Serjania lethalis* é uma rica fonte de isoprenóides e polifenóis (Hegnauer, 1970). Corrêa (1926) a descreve como uma bela planta ornamental, e como as demais do gênero com grande atividade narcótica, porém mais venenosa que as demais, popularmente conhecida como mata-fome. Teixeira et al (1984) relatam que *Serjania lethalis* apresentou efeitos ictiotóxicos e que serjanosídeos isolados apresentaram-se cerca de 15 vezes mais tóxicos que algumas saponinas. Os efeitos ictiotóxicos causados pelos gêneros *Serjania* e *Paullinia* são conhecidos e muito utilizados na pescaria (Guarim Neto et al., 2000). Grisi et al (2011) encontraram elevada atividade herbicida em extratos de frutos de *Sapindus saponaria* sobre *Lactuca sativa* (alface), *Allium cepa* (cebola), *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola).

2. Objetivo

Estudar a fitotoxicidade de frações de extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* sobre o crescimento de plântulas e comprimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*) .

3. Material e Metodologia

3.1 Material vegetal

Folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* A.St- Hil foram coletadas de pelo menos dez indivíduos diferentes, na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). Foram consideradas jovens as folhas que apresentaram textura membranácea e coloração verde clara, as folhas maduras apresentaram textura coriácea e coloração verde escura (Grisi et al., 2011). O material vegetal foi seco em estufa de circulação a 40 °C durante 72h e em seguida triturado em moinho elétrico e armazenados em sacos plásticos devidamente lacrados. Foi depositado um voucher (8340) no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar).

3.2 Extração

Foram preparados extratos aquosos e etanólicos com o pó das folhas jovens e maduras, utilizando 1L de água destilada e 100g de pó das folhas, que permaneceram durante 24h em geladeira a 4°C, foram filtrados a vácuo, congelados a -70°C e liofilizados. Os extratos etanólicos passaram pelo mesmo procedimento, porém a extração foi feita utilizando-se etanol e após a filtragem os extratos etanólicos foram secos em evaporador rotativo.

Os extratos etanólicos dos dois tipos de folhas foram fracionados por cromatografia de coluna com sílica gel de fase normal (0.063-0.2 mm / 70-230 mesh) com 450 mL dos eluentes na seguinte ordem: hexano: acetona (7:3); hexano: acetona (3:7); acetona (1); acetona: metanol (7:3); acetona: metanol (3:7); metanol (1); metanol: água (9:1). Os extratos aquosos também passaram pelo mesmo processo, porém com os

eluentes: acetona (1); acetona: metanol (7:3); acetona: metanol (3:7); metanol (1); metanol: água (9:1) (Figura 3). Após a separação cromatográfica as frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e algumas foram agrupadas devido à similaridade química. A tabela 1 resume o processo de reunião das frações e identificação.

Tabela 1. Frações de extratos aquosos e etanólicos de folhas jovens e maduras reunidas após a cromatografia de camada delgada (CCD) com seus respectivos códigos: **Fje** (Extrato etanólico de folhas jovens) **Fme** (Extrato etanólico de folhas maduras) **Fja** (Extrato aquoso de folhas jovens) **Fma** (Extrato aquoso de folhas maduras).

Extrato	Eluente	Fração	Código
<i>Extrato etanólico de folhas jovens</i>	Hex: Ac (7:3); Hex:Ac (3:7); Ac (1)	F1	Fje1
	Ac: MeOH (7:3)	F2 (Ativa)	Fje2
	Ac:MeOH (7:3)	F3 (Ativa)	Fje3
	Ac:MeOH (3:7)	F4	Fje4
	Ac:MeOH (3:7) MeOH (1)	F5 (Ativa)	Fje5
	MeOH: H ₂ O (9:1)	F6	Fje6
<i>Extrato etanólico de folhas maduras</i>	Hex: Ac (7:3) Hex:Ac (3:7)	F7+F8 (Ativas reunidas)	Fme1
	Hex:Ac (3:7)	F9	Fme2
	Ac (1)	F10	Fme3
	Ac: MeOH (7:3); Ac:MeOH (3:7); MeOH (1); MeOH: H ₂ O (9:1)	F11	Fme1
<i>Extrato aquoso de folhas jovens</i>	Ac (1); Ac: MeOH (7:3); Ac:MeOH (3:7); MeOH (1); MeOH: H ₂ O (9:1)	F12	Fja1
<i>Extrato aquoso de folhas maduras</i>	Ac (1); Ac: MeOH (7:3)	F13	Fma1
	Ac:MeOH (3:7)	F14	Fma2
	MeOH (1); MeOH: H ₂ O (9:1)	F15	Fma3

3.3 Seleção das frações a serem testadas

Foram testadas apenas as frações que apresentaram atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Cap. 1) foram elas: **Fje2; Fje3; Fje5 e Fme1.**

3.4 Bioensaio de avaliação do crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Sementes de gergelim foram pré-germinadas em água destilada e quando apresentaram 2mm de comprimento de raiz primária foram colocadas em caixas plásticas transparentes de 500mL (14 x 10 cm) contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 13 mL de solução de cada fração solubilizadas em DMSO (5%) e água destilada, nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. O controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL[®] nas mesmas concentrações e o controle negativo foi feito com água destilada com DMSO (5%). As caixas foram colocadas em sacos plásticos transparentes e mantidas em câmara de germinação a 28°C com fotoperíodo de 12 h (Carvalho et al., 2001). Após sete dias foram medidos o comprimento da parte aérea e da raiz primária com o auxílio de um paquímetro digital. As plântulas que apresentaram características anormais, segundo a RAS (2009), foram quantificadas e qualificadas.

3.5 Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Sementes de gergelim foram pré-germinadas em água destilada e mantidas por 24 horas em câmara de germinação a 28°C com fotoperíodo de 12 h (Carvalho et al., 2001). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão da raiz primária (RAS, 2009).

As sementes pré-germinadas foram colocadas em caixas plásticas transparentes de 250 mL com duas folhas de papel filtro umedecidas com 8 mL de cada fração diluída em água com 5% de DMSO nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. Foram feitas três réplicas para cada concentração, com 10 sementes em cada caixa. O controle negativo utilizado foi água destilada com 5% de DMSO, o controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL[®], nas mesmas concentrações das frações. As caixas plásticas foram colocadas em sacos transparentes e mantidas em B.O.D. a 28°C com fotoperíodo de 12 horas. Após quatro dias as plântulas foram retiradas das caixas e tiveram um segmento da raiz primária cortado com estilete, este foi mantido em álcool 70% (Gatti et al., 2010), em estufa a 40°C durante sete dias. Posteriormente, as raízes foram lavadas com água destilada e mantidas em solução de hidróxido de sódio 25%, em estufa a 40°C, durante dois dias para clarificá-las. Após a clarificação os segmentos das raízes foram corados com o corante Lacmóide, durante 24 h, lavados para retirar o excesso de corante e plaqueados, para tanto cada segmento foi colocado em uma lâmina de vidro e cobertos com uma gota de xarope Apathy e uma lamínula. Este material permaneceu em repouso durante 7 dias para secagem. Todo o procedimento de coloração das raízes foi feito segundo o método de Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997).

A observação foi feita em microscópio óptico (Olympus- BX41) com câmera acoplada (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro raízes primárias submetidas às frações ou aos controles. De cada raiz foram medidas 10 células centrais do metaxilema, com aumento de 20 vezes e auxílio do programa ImageJ.

3.6 Análises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados normais e homogêneos foi utilizado ANOVA seguida do teste de Tukey, para dados não normais e não homogêneos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, no programa Past 2.14. Também foi calculada a porcentagem de plântulas anormais obtidas em cada tratamento.

4. Resultados e Discussão

4.1 Rendimento

Foi calculado o rendimento (em g) de cada fração obtida por meio do fracionamento em cromatografia de coluna, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Massa obtida de cada fração de extrato aquoso e etanólico de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*

Fração	Massa obtida (g)
Fje1	0,47
Fje2	0,68
Fje3	2,80
Fje4	0,97
Fje5	1,18
Fje6	0,35
Fja1	2,92
Fme1	0,80
Fme2	0,10
Fme3	0,32
Fme4	4,00
Fma1	2,14
Fma2	0,38
Fma3	0,73

4.2 Crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

O crescimento da raiz das plântulas nas frações **Fje2**; **Fje3**; **Fje5** e **Fme1** diferiu significativamente do controle na concentração 0,8 mg. mL⁻¹ (figura 1a), sendo que a fração **Fje5** produziu a menor média de comprimento (1,16 cm), assemelhando-se ao efeito provocado pelo herbicida. A parte aérea das plântulas foi afetada negativamente apenas pelas frações **Fje3** e **Fje5** a 0,8 mg. mL⁻¹ (figura 1b). As frações **Fje2**, **Fje3**, **Fje5** e **Fme1** causaram efeitos inibitórios na raiz na concentração 0,4 mg. mL⁻¹, porém

nenhuma fração inibiu o crescimento da parte aérea na concentração 0,4 mg. mL⁻¹ (figuras 1c e 1d, respectivamente). A fração **Fje5** produziu a menor média de comprimento das raízes na concentração 0,2 mg. mL⁻¹ (2 cm) (figura 1e), diferindo estatisticamente do controle negativo; as frações **Fje2** e **Fje3** também foram responsáveis pela inibição do crescimento da raiz na concentração 0,2 mg. mL⁻¹, a fração **Fme1** não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (figura 1e). O crescimento da parte aérea na concentração 0,2 mg. mL⁻¹ não foi afetado por nenhuma fração (figura 1f). O controle positivo GOAL[®] diferiu significativamente do controle negativo e das frações em todas as concentrações.

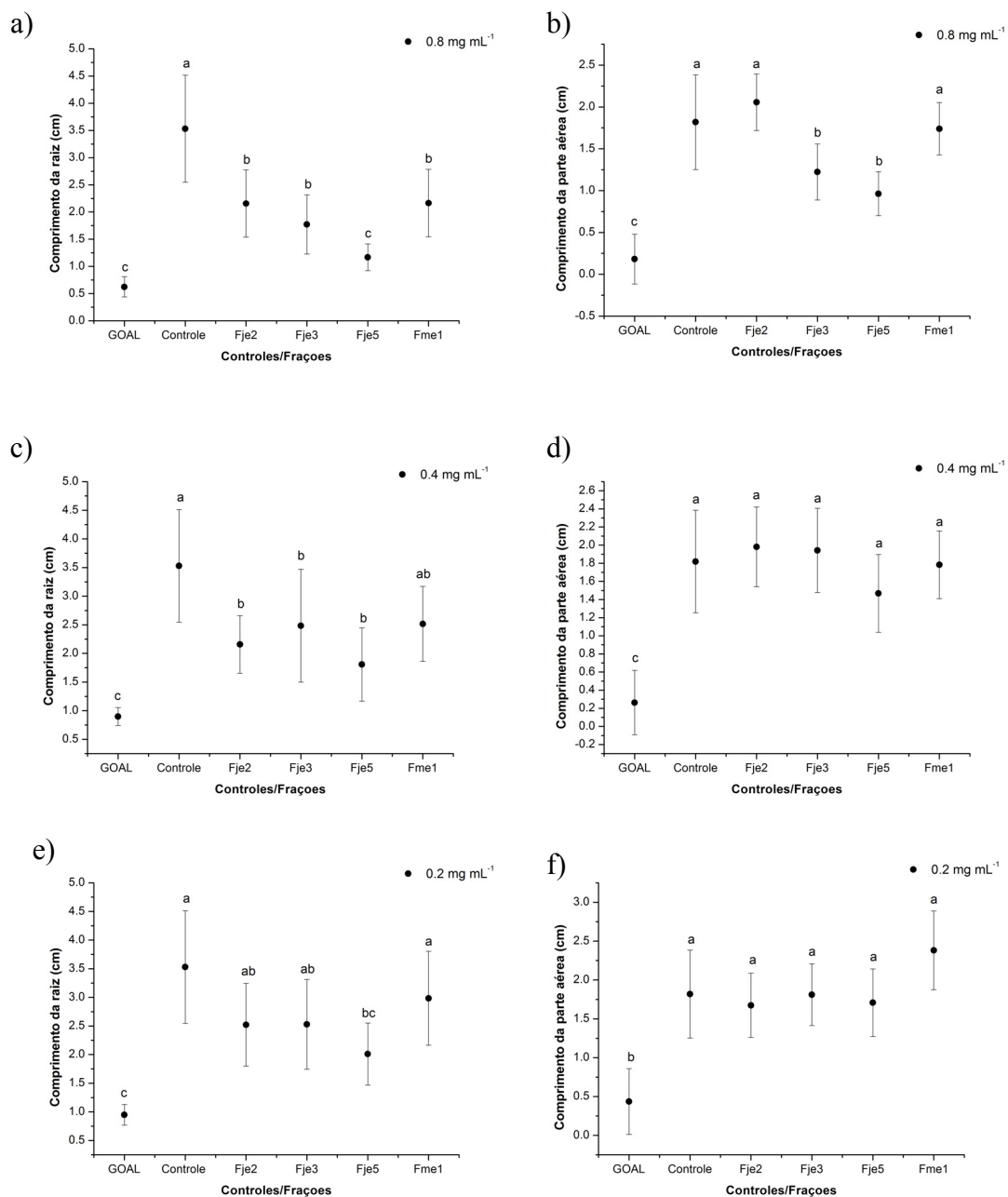


Figura 1. Valores médios de comprimento da raiz e parte aérea de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), submetidas ao efeito das frações de extratos de folhas de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. Valores com letras diferentes indicam diferença significativa, pelo teste ANOVA a 0,05% de probabilidade. As barras verticais indicam o desvio padrão em relação às médias.

Os aleloquímicos são capazes de interferir em reações fisiológicas e bioquímicas do crescimento e desenvolvimento de plântulas (Weir et al., 2004). A absorção de sais minerais e água pela raiz são comprometidas pelas alterações de enzimas presentes na membrana plasmática, assim a síntese de proteínas, respiração e fotossíntese são prejudicadas, levando à redução do tamanho da plântula (Bogatek e Gniazdowska, 2005). Extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* foram responsáveis por causar inibições no crescimento de plântulas de espécies daninhas, principalmente na raiz, em alguns casos o efeito causado pelo extrato etanólico foi igual ou superior ao provocado pelo herbicida utilizado como controle positivo (Grisi et al., 2013). Estes resultados corroboram os encontrados no presente trabalho, quando se observa o efeito causado no comprimento da raiz, pela fração **Fje5** na concentração de $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$. Observa-se que o efeito inibitório do crescimento foi estatisticamente igual ao provocado pelo herbicida, porém o mesmo efeito não foi registrado para a parte aérea. As alterações provocadas pelas frações impedirão que as plântulas desenvolvam-se normalmente, comprometendo seu estabelecimento.

A figura 2 apresenta as fotos das raízes e partes aéreas das plântulas de gergelim na concentração $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$. Nesta concentração todas as frações reduziram o tamanho da raiz e parte aérea das plântulas.

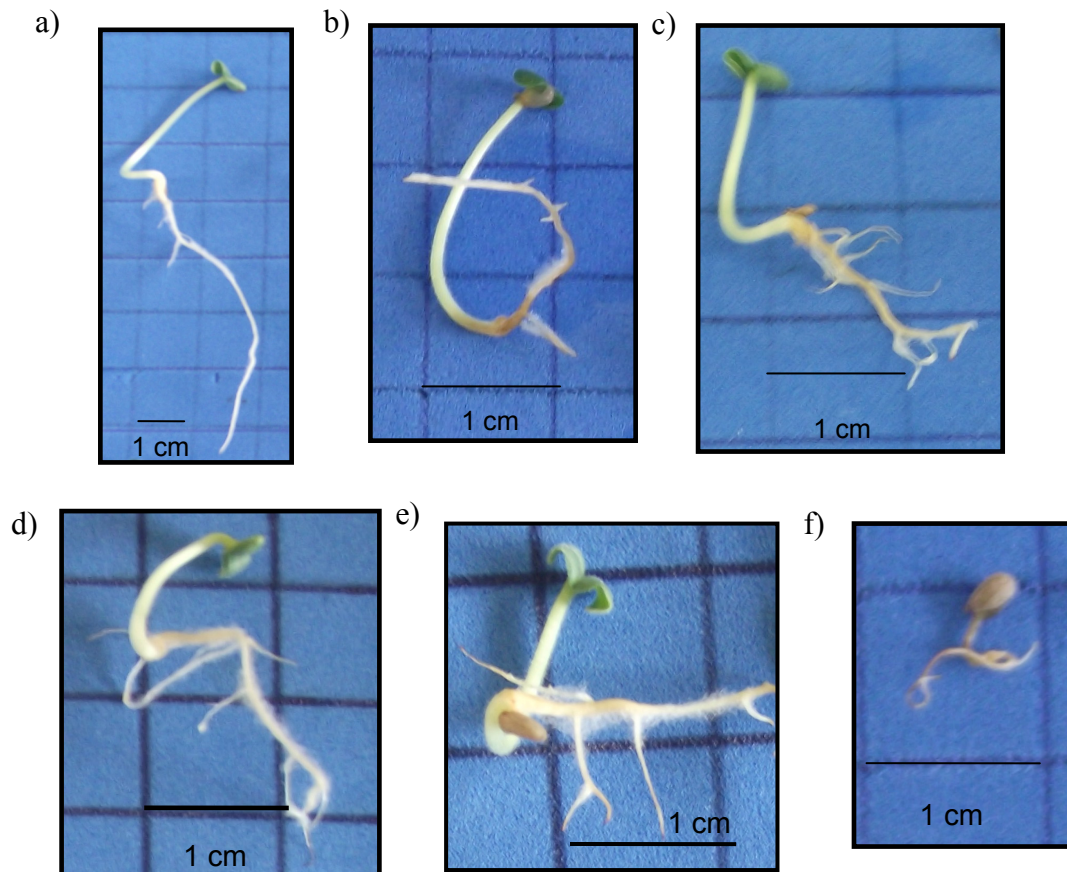


Figura 2. Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) após sete dias em contato com frações de extratos de folhas de *Serjania lethalis* na concentração $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$ a) Controle b) Fje2 c) Fje3 d) Fje5 e) Fme1 f) GOAL. (Foto: Pereira, V.C. 2012)

A tabela 3 apresenta as porcentagens de plântulas anormais obtidas em cada tratamento, assim como a anormalidade predominante no mesmo, segundo a RAS (2009).

Tabela 3. Porcentagem e tipo de anomalia presente em cada concentração de cada fração de extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis*. Necrose (N); Atrofia (A); Inversão Gravitropica (IG).

Fração	Porcentagem (%) de anomalia em cada concentração (mg mL ⁻¹)			Anomalia		
	0.8	0.4	0.2	0.8	0.4	0.2
Fje2	65	62,5	50	N/ A/ IG	N/A/IG	N/A
Fje3	92,5	75	57,5	N/ A/ IG	N/A/IG	N/A/IG
Fje5	80	62,5	52,5	N/ A/ IG	N/A/IG	N/A/IG
Fme1	75	63,7	52,5	N/ A/ IG	N/A/IG	N/A/IG

De acordo com a tabela 3 é possível notar que a porcentagem de plântulas anormais foi dependente da concentração testada, sendo que as maiores concentrações apresentaram as maiores porcentagens. A fração **Fje3** foi responsável pelas maiores porcentagens de anomalia em todas as concentrações, ao contrário da fração **Fje2** que apresentou as menores porcentagens. As anomalias detectadas foram necrose, atrofia e inversão gravitropica. As necroses observadas nas plântulas de gergelim causaram a morte dos indivíduos porque ocasionam o apodrecimento do tecido vegetal, já a atrofia e a inversão gravitropica causaram deformações físicas nas plântulas, impedindo que a mesma mantenha suas raízes eretas e possa se estabelecer e se desenvolver.

Estas observações contribuem para a confirmação da hipótese de que frações obtidas de extratos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento de plântulas e assim apresentar características de um herbicida natural.

4.3 Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

As frações **Fje2**, **Fje3**, **Fje5** e **Fme1** foram submetidas ao bioensaio que avalia o crescimento de células do metaxilema de gergelim que cresceram em contato com estas frações. Os resultados obtidos indicam que na concentração 0,8 mg. mL⁻¹ todas as frações produziram efeito inibitório no comprimento, em relação ao controle negativo, sendo que as células do metaxilema de gergelim expostas à fração **Fje5** apresentaram os menores valores médios de comprimento (95,50 µm), sendo este efeito similar ao produzido pelo herbicida. As mesmas frações mencionadas acima apresentaram atividade inibitória no crescimento das células na concentração 0,4 mg. mL⁻¹. Na concentração 0,2 mg. mL⁻¹ foi observada inibição do crescimento das células apenas nas frações **Fje2**, **Fje3** e **Fje5** (Tabela 4). O controle positivo feito com o herbicida GOAL[®] causou diferenças significativas quando comparado com os efeitos causados pelas frações e pelo controle negativo. A figura 3 apresenta as imagens das células do metaxilema de gergelim que cresceram em cada tratamento na concentração 0,8 mg. mL⁻¹.

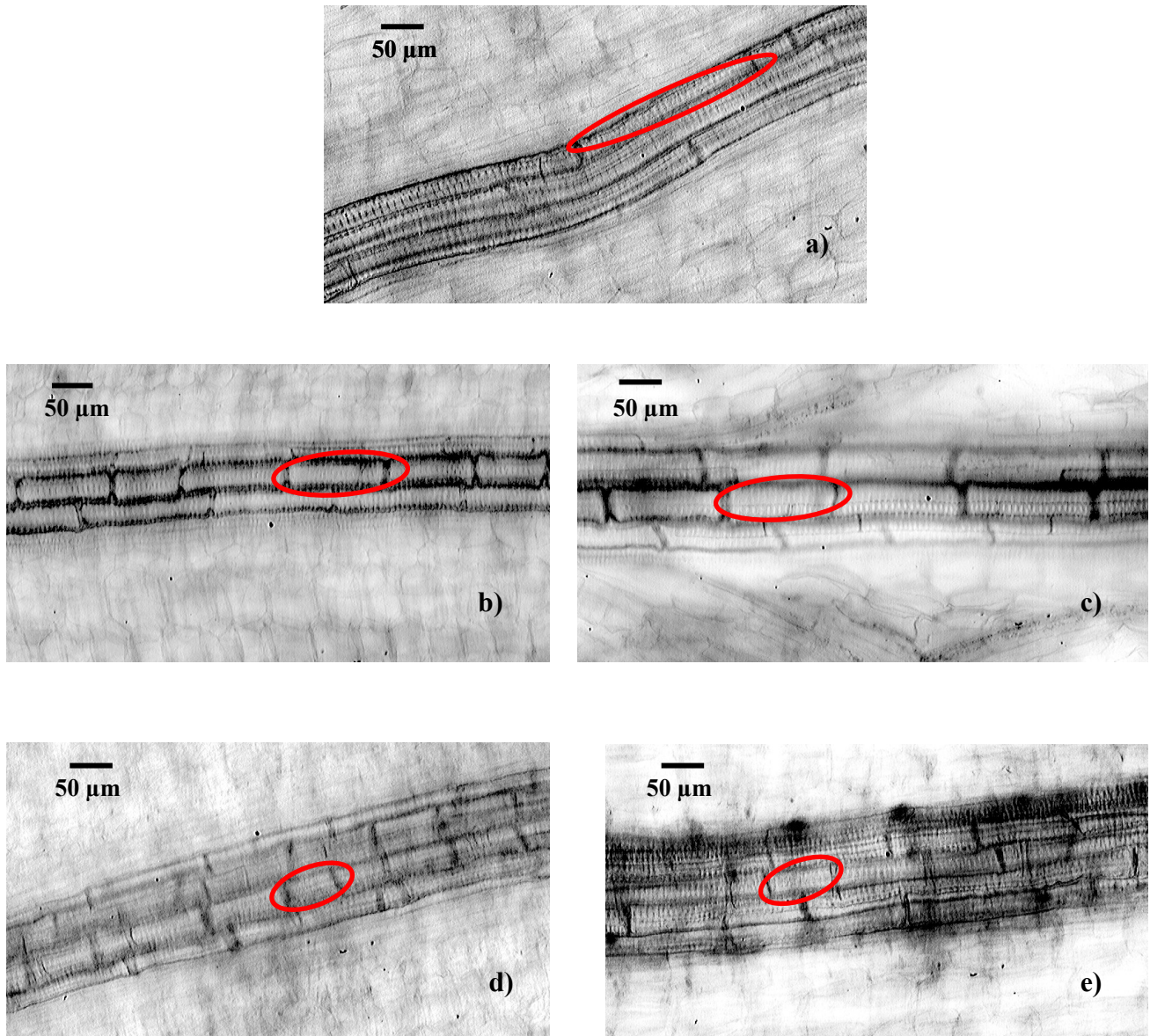


Figura 3. Células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*) crescidas nos tratamentos de controle negativo (a), Fje2 (b), Fje3 (c), Fje5 (d), Fme1 (e) na concentração de 0,8 mg. ml⁻¹. (Foto: Pereira, V.C. 2012). Os círculos destacam o comprimento das células.

Gatti et al (2010) obteve resultados semelhantes com células do metaxilema de gergelim crescidas sob extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae*. O crescimento das células é interrompido sob situações de estresse, sendo a auxina o agente responsável pela regulação do tamanho das células. Estas controlam o crescimento, arquitetura de caules e raízes, respostas trópicas à luz, dentre outros processos (Tamimoto, 2005). As frações testadas comprometeram o crescimento normal das células do metaxilema, comprometendo, desta forma, o desenvolvimento dos tecidos e conseqüentemente o desenvolvimento do vegetal, outros estudos também comprovam o potencial de *Serjania lethalis* sobre o crescimento de células do metaxilema, onde extratos etanólicos de folhas e caule de *S. lethalis* causaram inibição do crescimento de células do metaxilema de amendoim-bravo (Grisi et al., 2013). Segundo Al-Wakeel et al. (2007) os compostos do metabolismo secundário vegetal agem diretamente no processo de divisão celular, assim como no equilíbrio hormonal do vegetal.

Tabela 4. Comprimento das células do metaxilema (μm) de gergelim (*Sesamum indicum*), submetidas ao efeito das frações dos extratos de folhas de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Fração / Controle	Comprimento das células (μm) comparado com o controle ^{a)}		
	Concentração (mg. ml^{-1})		
	0,8	0,4	0,2
Fje2	113,50 cd	156,25 b	187,00 b
Fje3	165,25 b	144,50 b	149,00 bc
Fje5	95,50 d	144,25 b	159,50 bc
Fme1	141, 25 bc	164,50 b	297,75 a
GOAL[®]	84,50 d	71,00 c	133,25 c

a) O valor médio do controle foi de 287,25 μm . Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Ao observar tabela 4 é possível notar que a fração **Fje5** foi responsável pelos menores valores médios de comprimento das células do metaxilema nas concentrações 0,8 e 0,4 mg. mL^{-1} , esta mesma fração também produziu efeitos semelhantes no crescimento de plântulas, especialmente no crescimento da raiz.

A inibição do crescimento das plântulas está diretamente associada com a inibição do crescimento de células do metaxilema de gergelim, o mesmo foi concluído no trabalho desenvolvido por Grisi et al. (2013) onde foi observado que a inibição do crescimento de plântulas de amendoim-bravo foi associada com a inibição do crescimento de células do metaxilema de gergelim.

Desta forma pode-se inferir que extratos etanólicos de folhas jovens e maduras de *Serjania lethalis* foram fitotóxicos para o crescimento de plântulas e células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*), sendo estes efeitos mais pronunciados perante a fração de extrato etanólico de folhas jovens **Fje5**.

5. Conclusões

As frações testadas apresentaram efeito fitotóxico sobre o crescimento de plântulas e células xilemáticas de gergelim (*Sesamum indicum* L.).

A fração **Fje5** apresentou-se mais fitotóxica que as demais, sendo seu efeito semelhante ao provocado pelo herbicida comercial GOAL[®].

O tamanho reduzido das plântulas foi devido à redução do tamanho das células xilemáticas.

As plântulas submetidas a extratos foliares sofreram anomalias como necrose, atrofia e inversão gravitrópica.

Referências Bibliográficas

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Distributional patterns in Brazilian Serjania (Sapindaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.4, n.1, p.69-82, 1990.

- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS-FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.11, p.1083-1086, 2004.

- AL-WAKEEL, S. A .M.; GABR, M. A.; HAMID, A. A.; ABU-EL-SOUD, W. M. Allelopathic effects of *Acacia nilotica* leaf residue on *Pisum sativum* L. **Allelopathy Journal**, v. 19, n.2, p. 411-422, 2007.

- BOGATEK, R; ORACZ, K; GNIAZDOWSKA, A. Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. **Fourth World Congress in Allelopathy**, 2005.

- CARVALHO, P.G.B.; BORGUETTI, F.; BUCKERIDGE, M.S.; MORHY, L.; FERREIRA-FILHO, E.X.F. Temperature-dependent germination and endo-b-mannase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 139-148, 2001.

- CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Volumes I, II, III, IV, V, VI. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926 – 1978.

- DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

- FERNANDES, G. W.; NEGREIROS, D. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. **Ecological Entomology**, v.26, n.1, p.46–55, 2001.

- GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotelochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasilica**, v.24, n.2, pp. 454-461, 2010.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 311-322, 2011.

- GRISI, P. U. ; RANAL, M.A. ; GUALTIERI, S.C.J.; SANTANA, D.G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2012

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C., FORIM, M.R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.

- GUARIM NETO, G.; SANTANA, S.R. & SILVA, J.V.B.. Notas etnobotânicas de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botânica Brasileira**, v.14, n.3, p. 327-334, 2000.

- HEGNAUER, W. Chemotaxonomie der Pflanzen, Sapindaceae, **Springer Verlag**, v. 6, p. 271, 1970 .

- IMATOMI, M. Potencial alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 102p. 2010.

- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v.61, n.1, pp. 28-44, 1995.

- INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2012. <
<http://www.international-allelopathy-society.org/>> (Acesso em 30 de janeiro de 2013).

- KIM, Y.O.; JOHNSON, J.D.; LEE, E.J. Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three Phytolaccaceae species in South Korea. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n.5, pp. 1175- 1186, 2005.

- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Seropédica, Editora Universitária Rural, 198p, 1997.

- OLIVEIRA, M.S.; DORS, G.C.; SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.18, n.3, p. 267-275, 2007.

- PIRES, E.V. Estudo fitoquímico da espécie *Serjania lethalis* A.St-Hil. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 110p., 2008.

- REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES (RAS). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 398p, 2009.

- RICE, E.L. **Allelopathy**. 2.ed. New York:Academic, 422p. 1984.

- RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Natural products for pest management. In: Rimando A. M et al. **Natural products for Pest Management**; ACS Symposium Series: American Chemical Society: Washington, 2006.

- SOUZA FILHO, A. P. S. ; SANTOS, R.A., SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

- TAMIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 249–265. 2005

- TEIXEIRA, J. R. M.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R., Timbós: ichthyotoxic plants used by brazilian indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, p. 311–318, 1984.

- TRAORE. F.; FAURE, R.; OLIVIER, E.; GASQET, M.; AZAS, N.; DEBRAWER, L.; KEITA, A.; TIMON-DAVID, P.; BALANSARD, G. Structure and antiprotozoal

activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. **Planta Medica**, v. 66, pp. 368-371, 2000.

- TSUZUKI, J.K.; SVISZINSKI, T.I.E.; SHINOBU, C.S.; SILVA, L.F.A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Antifungal activity of the extracts from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, pp. 577-583, 2007.

- WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p.472-479, 2004.

CAPÍTULO IV

**Potencial fitotóxico de saponinas de folhas, raízes e caules de *Serjania*
lethalis A.St-Hil**

RESUMO - O gênero *Serjania* é pertencente à família Sapindaceae, que possui cerca de 35 espécies amplamente distribuídas no Brasil. *Serjania lethalis* é uma liana tipicamente encontrada no cerrado brasileiro e utilizada na medicina popular. As saponinas pertencem a um vasto grupo de glicosídeos, amplamente distribuído no reino vegetal e característico da família Sapindaceae. Apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, a saber: atividade antimicrobiana, anti-hemolítica, anticâncer, moluscicida, anti-inflamatória, anti-parasítica e citotóxica. São compostos solúveis à água, formadores de espuma quando agitados, possuem uma parte lipofílica e outra hidrofílica, composta por açúcares, dispostos em cadeias lineares ou ramificadas, com elevada massa molecular. Este grupo de compostos apresenta grande interesse fitoquímico e estudos anteriores revelaram que extratos brutos exerceram efeitos fitotóxicos em espécies bioindicadoras e invasoras. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a fitotoxicidade de frações enriquecidas com saponinas, presentes em diferentes órgãos vegetais. Foram feitas extrações com o pó de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* A. St- Hil, utilizando os eluentes metanol e água para a obtenção de extratos, onde estariam presentes as saponinas. Posteriormente foi feita uma pré-purificação desses extratos, utilizando a técnica de Extração em Fase Sólida com os eluentes metanol e água em diferentes proporções, produzindo, dessa forma, as frações. Foram obtidas trinta frações, sendo dez de cada órgão, porém apenas onze destas apresentaram massa suficiente para a avaliação da fitotoxicidade por meio do bioensaio que avalia o crescimento de coleóptilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L.). Cinco fragmentos de coleóptilos (4 mm) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de cada uma das frações-teste diluídas em uma solução tampão composta por sacarose, ácido cítrico e fosfato de potássio di-básico. Foram utilizadas as concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹. O controle negativo foi feito com a solução tampão e o controle positivo foi feito com o herbicida comercial GOAL[®] nas mesmas concentrações e em triplicata. Os tubos foram tampados, colocados em um rotor a 6 rpm

durante 24 h, a 25 °C, no escuro. Depois os coleóptilos foram retirados dos tubos, distribuídos em planilha para serem fotografados e medidos (Image – Pro Plus 5.0[®]). Os resultados obtidos indicam que estas frações apresentam potencial fitotóxico, sendo as provenientes de raiz e folhas de *S. lethalis* as mais fitotóxicas para os coleóptilos. Algumas frações provenientes dos mesmos órgãos acima citados apresentaram efeito semelhante ao causado pelo herbicida comercial GOAL[®] utilizado como controle positivo.

Palavras- chave: Saponinas, extração em fase sólida, fitotoxicidade

ABSTRACT - The genus *Serjania* belongs to the Sapindaceae family, which has about 35 species widely distributed in Brazil. *Serjania lethalis* A. St- Hil is a liana typically found in the Brazilian cerrado and used in popular medicine. Saponins belong to a large group of glycosides, widely distributed in the plant kingdom and characteristic of family Sapindaceae. They exhibit a broad spectrum of biological activities, namely: antimicrobial activity, anti-hemolytic, anti-cancer, molluscicidal, anti-inflammatory, anti-parasitic and cytotoxic. Saponins are water-soluble compounds, foam makers when shaken, have a lipophilic part and another hydrophilic, consisting of sugars, arranged in straight or branched chains with a high molecular mass. This group of compounds shows great phytochemical interest and previous studies have revealed that crude extracts had phytotoxic effects on bioindicator and invasive species. Thus, this study aimed to evaluate the phytotoxicity of saponins in particular, present in different plant organs. Extractions were done with the powder of leaves, root and stem of *S. lethalis*, using eluents methanol and water to obtain extracts which would be present saponins. Later it was made a pre-purification of these extracts, using the technique of Solid Phase Extraction with eluents methanol and water in different proportions, thereby producing the fractions. Thirty fractions were obtained, ten of each organ, but only eleven of these exhibited sufficient mass to assess the phytotoxicity through bioassay that measures the etiolated coleoptile growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Five fragments of coleoptile (4 mm) were placed in tubes containing 2 ml of each test fractions diluted in a buffer solution composed of sucrose, citric acid and potassium phosphate di-basic. It were used concentrations of 0.8, 0.4 and 0.2 mg mL⁻¹. The negative control was done with the buffer solution and the positive control was done with the commercial herbicide GOAL[®] at the same concentrations and in triplicate. The tubes were capped, placed on a rotator at 6 rpm for 24 h at 25 °C, in the dark. After coleoptiles were removed from the tubes, distributed in spreadsheet in order to be photographed and measured (Image - Pro Plus 5.0[®]). The results indicate that these fractions have

phytotoxic potential, and the ones from the root and leaves of *S. lethalis* the most phytotoxic to coleoptiles. Some fractions from the same organs above mentioned showed similar effect to that caused by commercial herbicide GOAL[®] used as positive control.

Keywords: Saponins, solid phase extraction, phytotoxicity

1. Introdução

Serjania lethalis é uma liana tipicamente encontrada no cerrado brasileiro (Fernandes e Negreiros, 2001), pertencente à família Sapindaceae, conhecida por ser uma rica fonte de saponinas (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006).

As saponinas pertencem a um vasto grupo de glicosídeos amplamente distribuído no reino vegetal, porém suas propriedades as diferenciam dos demais glicosídeos. São solúveis à água e formam espuma quando agitadas (Tyler et al., 1981). Possuem uma parte lipofílica e outra hidrofílica, composta por açúcares que formam cadeias lineares ou ramificadas, também possuem elevada massa molecular (600 a 2000) (Simões et al., 2003). Trata-se de um composto do metabolismo secundário vegetal presente em membros da família Sapindaceae (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006).

As saponinas são classificadas em dois grupos, de acordo com a natureza do esqueleto de aglicona. O primeiro grupo contém saponinas esteroidais, estas são características de monocotiledôneas, o segundo grupo contém saponinas triterpênicas, comuns em espécies dicotiledôneas (Bruneton, 1995). São listadas diversas atividades biológicas para este grupo, como atividade hemolítica, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, anti-tumoral, citotóxica, antiviral (Sparg et al., 2004) e reguladora do crescimento de plântulas (Ohara e Ohira, 2003).

Outras atividades biológicas das saponinas incluem a redução do colesterol no sangue, como descrito no trabalho pioneiro de Cheek (1971), onde foi adicionada saponina na dieta de frangos, levando à redução do colesterol no sangue e tecido destes animais.

Poucos estudos relatam o potencial das saponinas como agentes fitotóxicos. O trabalho desenvolvido por Hernández-Carlos et al (2011) discute que saponinas provenientes da família Cucurbitaceae apresentam-se como promissoras pesticidas naturais, uma vez que apresentaram efeitos fitotóxicos sobre *Lycopersicon esculentum*,

Lolium perenne e *Lactuca sativa*. Neste mesmo trabalho também foram apresentados dados a respeito do potencial inseticida das saponinas sobre larvas de *Spodoptera littoralis*. Porém, ainda há carência de informações sobre esse grupo, presente em uma família amplamente distribuída. O conhecimento destas potencialidades pode colaborar para o enriquecimento de informações a respeito de espécies do cerrado.

2. Objetivos

Com base no que a literatura propõe e oferece de informações a respeito das atividades biológicas de saponinas, decidiu-se testar frações enriquecidas com saponinas presentes em folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

3. Material e Metodologia

3.1 Material vegetal

Folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis* foram coletados na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). O material vegetal foi seco em estufa de circulação a 40 °C durante 72h e em seguida triturado em moinho elétrico e armazenados em sacos plásticos devidamente lacrados. Foi depositado um voucher (8340) no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar).

3.2 Extração

O processo de extração seguiu dois protocolos.

3.2.1 Extração-Protocolo 1

Foram pesados, separadamente, 1g de pó de folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis* e transferidos para tubos falcon, onde foram adicionados 10 mL de metanol e agitados em vortex. Posteriormente foram adicionados 5 mL de água deionizada e novamente agitados em vortex. Os frascos foram colocados em ultrassom por 10 minutos. Em seguida foram centrifugados 10 mL do sobrenadante. Ao resíduo restante foi adicionado mais 5 mL de água deionizada e 10 mL de metanol, o conteúdo foi novamente agitado em vortex e novamente colocado no ultrassom. As três alíquotas foram transferidas para novos tubos e foram centrifugadas. Posteriormente foram concentradas em SpeedVac. Em seguida foram redissolvidas, reunidas em um só tubo e evaporadas.

3.2.2 Pré- purificação (Solid Phase Extraction, SPE)

Foi utilizado um cartucho (ODS, 500 mg) ativado com 5 mL de metanol, este foi condicionado com 10 mL de metanol/água (1: 9). O material extraído foi dissolvido em 5 mL de metanol/água (1: 9) e aplicado no cartucho condicionado, desta forma foi obtida a fração 1 (Fr1) (vide tabela 1 para nomenclatura das frações obtidas de cada material vegetal). Em seguida o cartucho foi eluído com 3 mL metanol/água (3:7) produzindo a fração 2 (Fr2); a fração 3 (Fr3) foi obtida com a eluição de 3 mL de metanol/água (1:1); a fração 4 (Fr4) foi obtida com a eluição de 3 mL de metanol/água (7:3) e finalmente a fração 5 (Fr5) foi obtida com 3 mL de metanol.

As frações foram transferidas para vials de HPLC (1,5 mL cada).

3.2.3 Extração- Protocolo 2

Foram pesados, separadamente, 1g de pó de folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis* e transferidas para tubos falcon, onde foram adicionados 5 mL de metanol e agitados em vortex. Posteriormente foram adicionados 10 mL de água deionizada e novamente agitados em vortex. Os frascos foram colocados em ultrassom por 10 minutos. Em seguida foram centrifugados 10 mL do sobrenadante. Ao resíduo restante foi adicionado mais 10 mL de água deionizada e 5 mL de metanol, o conteúdo foi novamente agitado em vortex e colocado em ultrassom. As três alíquotas foram transferidas para novos tubos e foram centrifugadas. Em cada uma das alíquotas foi adicionado 10 mL de água deionizada.

3.2.4 Pré-purificação (Solid Phase Extraction, SPE)

Foi utilizado um cartucho (ODS, 500 mg) ativado com 5 mL de metanol (figura 1), este foi condicionado com 10 mL de metanol/água (1: 9). O material extraído foi dissolvido em 5 mL de metanol/água (1: 9) e aplicado no cartucho condicionado, desta forma foi obtida a fração 1 (Fr1) (vide tabela 1 para nomenclatura das frações obtidas de cada material vegetal). Em seguida o cartucho foi eluído com 3 mL metanol/água (3:7) produzindo a fração 2 (Fr2); a fração 3 (Fr3) foi obtida com a eluição de 3 mL de metanol/água (1:1); a fração 4 (Fr4) foi obtida com a eluição de 3 mL de metanol/água (7:3) e finalmente a fração 5 (Fr5) foi obtida com 3 mL de metanol. A fração 1 de cada material vegetal foi concentrada em Speed Vac e redissolvida em 3 mL de metanol/água (1:1).

As frações foram transferidas para vials de HPLC (1,5 mL cada).

Tabela 1. Nomenclatura das frações obtidas de cada material vegetal (folhas, raiz e caule) por meio do protocolo 1 e 2, com seus respectivos eluentes.

Material Vegetal	Eluente (3mL)	Fração
Folhas	Metanol/ água (1:9)	*F1.1 *F2.1
	Metanol/ água (3:7)	F1.2 F2.2
	Metanol/ água (1:1)	F1.3 F2.3
	Metanol/ água (7:3)	F1.4 F2.4
	Metanol	F1.5 F2.5
Raiz	Metanol/ água (1:9)	R1.1 R2.1
	Metanol/ água (3:7)	R1.2 R2.2
	Metanol/ água (1:1)	R1.3 R2.3
	Metanol/ água (7:3)	R1.4 R2.4
	Metanol	R1.5 R2.5
Caule	Metanol/ água (1:9)	C1.1 C2.1
	Metanol/ água (3:7)	C1.2 C2.2
	Metanol/ água (1:1)	C1.3 C2.3
	Metanol/ água (7:3)	C1.4 C2.4
	Metanol	C1.5 C2.5

***F1.1- Fração obtida por meio do protocolo 1 com o primeiro eluente.**

***F2.1- Fração obtida por meio do protocolo 2 com o primeiro eluente.**

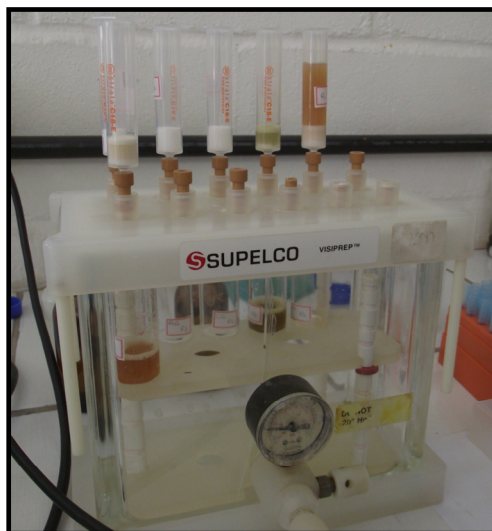


Figura 1. Extração em fase sólida de amostras de extratos de folha, raiz e caule de *Serjania lethalis* obtidos com metanol e água (Foto: Pereira, V.C. 2013)

3.3. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*)

A avaliação da atividade fitotóxica foi feita mediante o bioensaio de coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon). Para tanto, cariopses de trigo foram pré-germinadas com água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25°C por 4 dias em ausência de luz (Macías et al., 2010) . Posteriormente sob luz verde (Nitsch e Nitsch, 1956), para evitar a estagnação do crescimento das células, os coleóptilos foram cortados em 4 mm com uma guilhotina de Van der Weij, colocados em tubos de ensaio contendo solução tampão composta por sacarose (20 g/L), ácido cítrico monoidratado (1,05 g/L) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L), o pH foi ajustado para 5.6 , assim, cada tubo conteve a solução tampão, fração nas concentrações de 0,8; 0,4 ou 0,2 mg. mL⁻¹ e cinco coleóptilos. Foram feitas três réplicas com cada fração e de cada

diluição. Como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial GOAL[®] nas mesmas concentrações que as frações e como controle negativo foi utilizada a solução tampão. Os tubos foram mantidos em B.O.D. com rotação de 6 rpm durante 24h e ausência de luz (Macías et al., 2010). Após as 24h os coleóptilos foram retirados dos tubos, fotografados e o comprimento foi medido com o auxílio do programa ImageJ.

Este bioensaio foi realizado apenas com as amostras que possuíram massa suficiente para a avaliação.

3.4 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados normais e homogêneos foi utilizado ANOVA seguida do teste de Tukey com 0,05% de significância. Para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney.

4. Resultados e Discussão

4.1 Obtenção de frações ricas em saponinas

O processo de extração em fase sólida permitiu a obtenção de frações ricas em saponinas. O cartucho de sílica de fase reversa (C-18) utilizado reteve compostos apolares e permitiu a extração de compostos polares, esta característica da fase estacionária associada com o grau crescente nas proporções de metanol e água utilizadas permitiu que as frações iniciais apresentassem maior quantidade de compostos solúveis à água, porém o aumento da proporção de metanol (Fr4 e Fr5) possibilitou a extração de saponinas em maior quantidade, assim, assumimos que estes compostos estavam presentes principalmente nas frações **F1. 4; F1.5; F2.4; F2.5; R1.4; R1.5; R2.4; R2.5; C1.4; C1.5; C2.4 e C2.5**. A figura 2 ilustra as frações obtidas de cada material vegetal em cada protocolo testado.

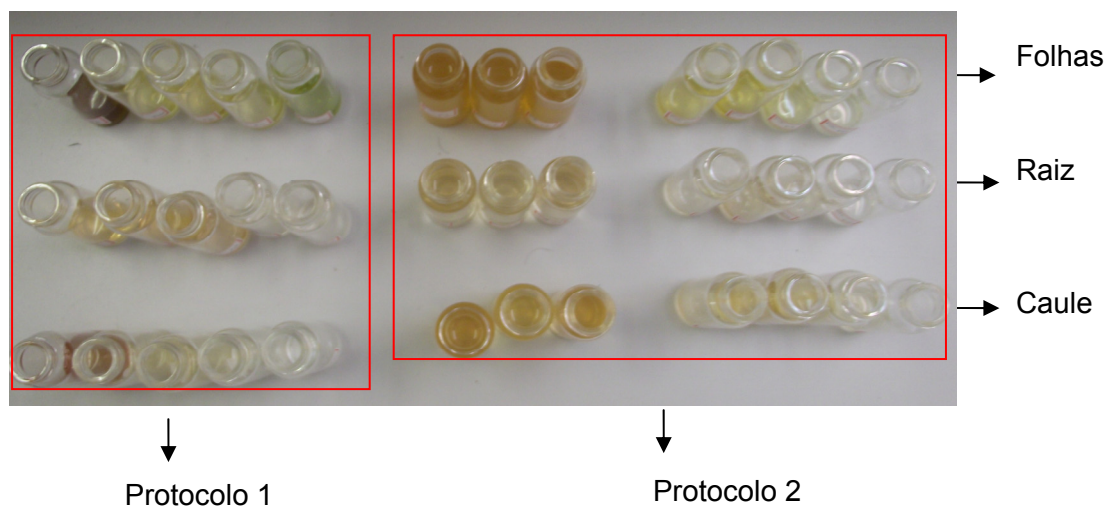


Figura 2. Amostras de cada material vegetal (folhas, raiz e caule) obtidas após a extração em fase sólida, por meio dos protocolos 1 e 2 (Foto: Pereira, V.C. 2013). Tubos de vidro com volume de 20 mL.

4.2 Bioensaio de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Foram testadas as frações **C1.1**; **C2.1**; **F1.1**; **F1.3**; **F2.1**; **F2.3**; **R1.1**; **R1.2**; **R1.5**; **R2.1** e **R2.2**, pois estas foram as que apresentaram massa suficiente para a realização do bioensaio.

Estes dados foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, onde o “zero” representa a longitude do controle, enquanto os valores positivos implicam no estímulo da característica analisada, e os negativos na inibição. Todas as amostras apresentaram atividade inibitória do crescimento dos coleóptilos de trigo, exceto a amostra **R1.2**, que não apresentou atividade em nenhuma concentração. Nota-se que a amostra **R1.5** foi responsável pela maior porcentagem de inibição do crescimento dos coleóptilos em todas as concentrações testadas 0,8 ;0,4 e 0,2 mg. mL⁻¹ (-34,43%; -34,34%; -30,11%, respectivamente). As amostras **F2.3**; **R1.1**; **F1.3**; **F1.1** e **C1.1** foram responsáveis pela inibição do crescimento dos coleóptilos em todas as concentrações testadas e as amostras **R2.1** e **R2.2** inibiram o crescimento dos coleóptilos apenas nas concentrações 0,8 e 0,4 mg.mL⁻¹. A amostra **C2.1** apresentou atividade inibitória apenas na concentração 0,8 mg. mL⁻¹. O controle feito com o herbicida GOAL[®] inibiu o crescimento dos coleóptilos em todas as concentrações testadas (Figura 3).

A figura 4 apresenta os coleóptilos de trigo e seus respectivos controles crescidos na concentração 0,8 mg. mL⁻¹.

As altas porcentagens de inibição provocadas pela fração **R1.5** pode ser explicada pelo fato desta fração ser mais enriquecida com saponinas, uma vez que foi utilizado apenas metanol durante a eluição, possibilitando, desta forma, a obtenção de uma fração mais rica em tais compostos. As demais frações (**C1.1**; **C2.1**; **F1.1**; **F1.3**; **F2.1**; **F2.3**; **R1.1**; **R2.1** e **R2.2**) também foram responsáveis pela inibição do crescimento dos coleóptilos de trigo. Tais

frações contém compostos polares que foram extraídos durante a eluição com metanol e água, sendo tais compostos fitotóxicos para o crescimento dos coleótilos de trigo.

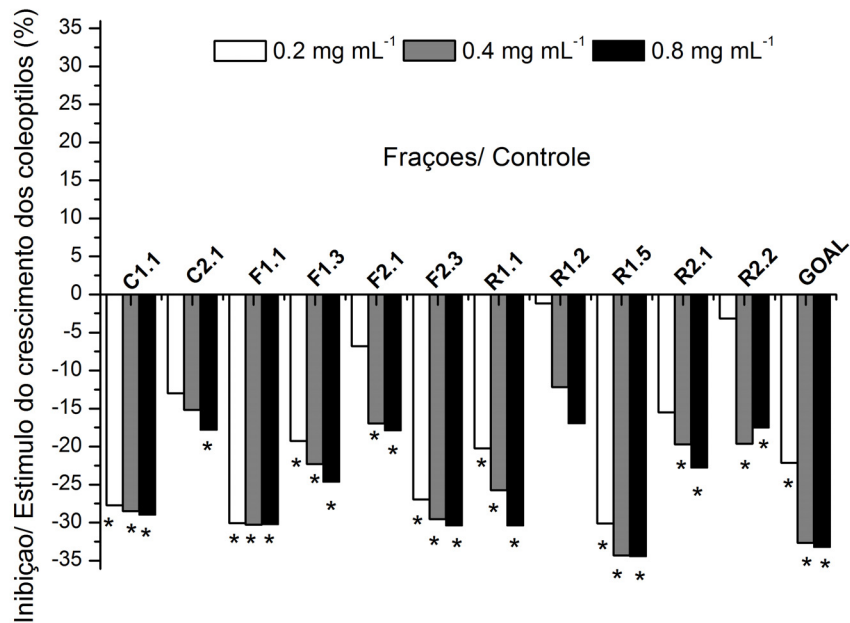


Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) em diferentes concentrações de saponinas extraídas de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis*. (*) indicam as amostras que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo.

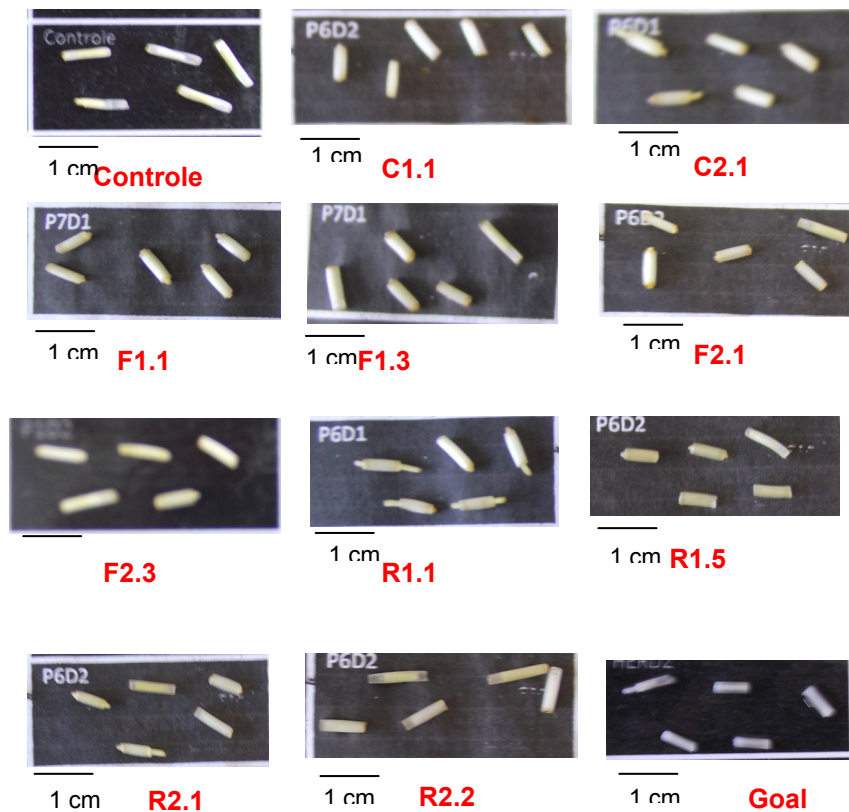


Figura 4. Efeito das frações provenientes de extratos de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* contendo saponinas e dos controles positivo (solução tampão) e negativo (herbicida GOAL[®]), sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Foto: Pereira, V.C. 2013)

Extratos vegetais, frações e substâncias purificadas de espécies vegetais do cerrado apresentaram inibição do crescimento de coleótilos de trigo nas mesmas concentrações testadas neste trabalho (Jatobá, 2012; Grisi et al., 2011). O estudo do potencial fitotóxico de espécies de Myrtaceae do Cerrado desenvolvido por Imatomi (2010) indica que extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila do pó de folhas de *Myrcia tomentosa* produziram altas taxas de inibição do crescimento de coleótilos de trigo.

A tabela 2 apresenta os comprimentos médios dos coleóptilos em cada tratamento, quando comparados com o controle negativo (solução tampão com DMSO). Estes dados diferem dos obtidos na figura 3, onde é avaliada a porcentagem de inibição de cada tratamento, e não o comprimento médio de cada coleóptilo.

Tabela 2. Comprimento médio dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à atividade do herbicida e das amostras extraídas de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações, comparados com o controle negativo.

Tratamento	Comprimento (mm)			
	0,8 mg. mL ⁻¹	0,4 mg. mL ⁻¹	0,2 mg. mL ⁻¹	Controle
C1. 1	4,50 ± 0,77 b	4,53 ± 0,27 b	4,56 ± 0,82 b	6,32 ± 0,17 a
C2. 1	5,20 ± 1,00 b	5,36 ± 1,21 ab	5,50 ± 1,60 ab	6,32 ± 0,17 a
F1. 1	4,43 ± 1,65 b	4,40 ± 0,49 b	4,53 ± 0,69 b	6,32 ± 0,17 a
F1. 3	4,76 ± 0,80 b	4,93 ± 0,96 b	5,00 ± 1,56 b	6,32 ± 0,17 a
F2. 1	5,20 ± 0,60 b	5,26 ± 0,92 b	5,90 ± 1,14 ab	6,32 ± 0,17 a
F2. 3	4,40 ± 0,48 b	4,46 ± 0,43 b	4,60 ± 0,49 b	6,32 ± 0,17 a
R1. 1	4,40 ± 0,55 b	4,70 ± 1,01 b	5,00 ± 1,46 b	6,32 ± 0,17 a
R1. 2	5,20 ± 1,16 a	5,56 ± 0,46 a	6,20 ± 2,80 a	6,32 ± 0,17 a
R1. 5	4,10 ± 0,67 b	4,15 ± 0,25 b	5,05 ± 0,92 b	6,32 ± 0,17 a
R2. 1	4,90 ± 0,35 b	5,00 ± 1,78 b	5,30 ± 1,61 ab	6,32 ± 0,17 a
R2. 2	5,20 ± 1,00 b	5,10 ± 0,53 b	6,10 ± 1,00 ab	6,32 ± 0,17 a
GOAL®	4,20 ± 0,61 b	4,23 ± 0,33 b	4,90 ± 1,06 b	6,32 ± 0,17 a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Observa-se que a amostra **R1.2** não apresentou diferença significativa sobre o comprimento dos coleótilos de trigo em relação ao controle negativo (solução tampão). As demais amostras apresentaram diferenças significativas em todas as concentrações, sendo a menor média causada pela amostra **R1.5** na concentração 0,8 mg. mL⁻¹ (4,10 mm).

A tabela 3 apresenta o comprimento médio dos coleótilos em cada tratamento, comparados com o controle positivo (herbicida GOAL[®])

Tabela 3. Comprimento médio dos coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à atividade do herbicida GOAL[®] e das amostras extraídas de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações, comparados com os submetidos à atividade do herbicida GOAL[®].

Tratamento	Comprimento (mm)		
	0,8 mg. mL ⁻¹	0,4 mg. mL ⁻¹	0,2 mg. mL ⁻¹
C1.1	4,50 ± 0,77 ab	4,53 ± 0,27 ab	4,56 ± 0,82 a
C2.1	5,20 ± 1,00 b	5,36 ± 1,21 c	5,50 ± 1,60 bc
F1.1	4,43 ± 1,65 ab	4,40 ± 0,49 b	4,53 ± 0,69 a
F1.3	4,76 ± 0,80 ab	4,93 ± 0,96 b	5,00 ± 1,56 b
F2.1	5,20 ± 0,60 b	5,26 ± 0,92 bc	5,90 ± 1,14 bc
F2.3	4,40 ± 0,48 ab	4,46 ± 0,43 ab	4,60 ± 0,49 a
R1.1	4,40 ± 0,55 ab	4,70 ± 1,01 ab	5,00 ± 1,46 b
R1.2	5,20 ± 1,16 b	5,56 ± 0,46 c	6,20 ± 2,80 c
R1.5	4,10 ± 0,67 a	4,15 ± 0,25 a	5,05 ± 0,92 b
R2.1	4,90 ± 0,35 ab	5,00 ± 1,78 bc	5,30 ± 1,61 ab
R2.2	5,20 ± 1,00 b	5,10 ± 0,53 bc	6,10 ± 1,00 c
GOAL[®]	4,20 ± 0,61 a	4,23 ± 0,33 a	4,90 ± 1,06 ab

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Ohara e Ohira (2003) avaliaram o crescimento e germinação de alface (*Lactuca sativa*) na presença da saponina betulina, e afirmam que o crescimento radicular das plântulas foi mais afetado do que o hipocótilo. Neste mesmo trabalho também foi testado o ácido betulínico e concluiu-se que o crescimento de radículas de alfafa foi fortemente inibido por este triterpenóide. Trabalhos como este corroboram os resultados obtidos neste trabalho, onde houve o registro de que as frações provenientes de extratos de folhas, raiz e caule de *S. lethalis* extraídas com metanol e água são ricas em saponinas, provocando inibição do crescimento dos coleótilos de trigo diferindo estatisticamente da média de crescimento provocada pelo controle negativo.

Os coleótilos que cresceram sob o efeito da fração **R1.5** nas concentrações 0,8 e 0,4 mg. mL⁻¹ apresentaram médias de crescimento (4,10 e 4,15 mm) estatisticamente iguais às obtidas no tratamento com o herbicida na mesma concentração (4,20 e 4,23 mm). Em alguns casos os efeitos inibitórios provocados pelas frações foram superiores aos causados pelo herbicida utilizado como controle positivo, como é o caso das frações **C1.1**; **F1.1** e **F2.3** na concentração 0,2 mg. mL⁻¹. Neste caso, os coleótilos mantidos em soluções preparadas no herbicida na concentração 0,2 mg. mL⁻¹ apresentaram médias de crescimento superiores às encontradas nas frações **C1.1**; **F1.1** e **F2.3** na mesma concentração. A fração obtida como o uso de pó de raízes de *S. lethalis* ocasionaram as menores médias de crescimento nas maiores concentrações, porém, já as frações obtidas de caule e folhas, foram mais ativas nas menores concentrações, quando comparadas com o controle positivo.

5. Conclusões

As frações enriquecidas com saponinas, obtidas por meio da extração em fase sólida de folhas, raiz e caule de *Serjania lethalis* foram fitotóxicas para o crescimento dos coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). A maior taxa de inibição foi provocada pela fração **R1.5**, obtida das raízes de *S. lethalis*. Leva-se a crer que as saponinas extraídas e presentes nesta fração causaram tal efeito.

Referências bibliográficas

- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Lavoisier Publishing, pp. 538-544, 1995.

- CHEEK, P.P. Nutritional and physiological properties of saponins: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 51, p. 621, 1971.

- FERNANDES, G. W.; NEGREIROS, D. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. **Ecological Entomology**, v.26, n.1, p.46–55, 2001.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 311-322, 2011.

- HERNANDEZ-CARLOS, B.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; OROZCO-VALENCIA, A.U.; RAMÍREZ-MARES, M.V.; ANDRÉS-YEVES, M.F.; JOSEPH-NATHAN, P. Saponinas bioativas de *Microsechium helleri* y *Sicyos bulbosus*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.38, 2011.

- IMATOMI, M. Potencial alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 102p. 2010.

- JATOBÁ, L.J. Compostos com potencial alelopático em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 98p. 2012.

- MACÍAS, F.A.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J.M.G. Isolation and Phytotoxicity of Terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, pp. 396-404, 2010.

- MURGU, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of Glycosides from *Sapindus saponaria* using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.7, p.1281-1290, 2006.

- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Studies on the growth coleoptile and first internode sections. A new sensitive straight- growth test for auxins. **Plant physiology**, v. 31, pp. 94-111, 1956.

- OHARA, S.; OHIRA, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. **Journal of Wood Sciences**, v. 49, pp. 59-64, 2003.

- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da Planta ao medicamento, **Editora Universidade/UFRGS**, 5 ed, 2003, 1102p.

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

- TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**, 8. ed. 1981, 67p.

Conclusões Finais

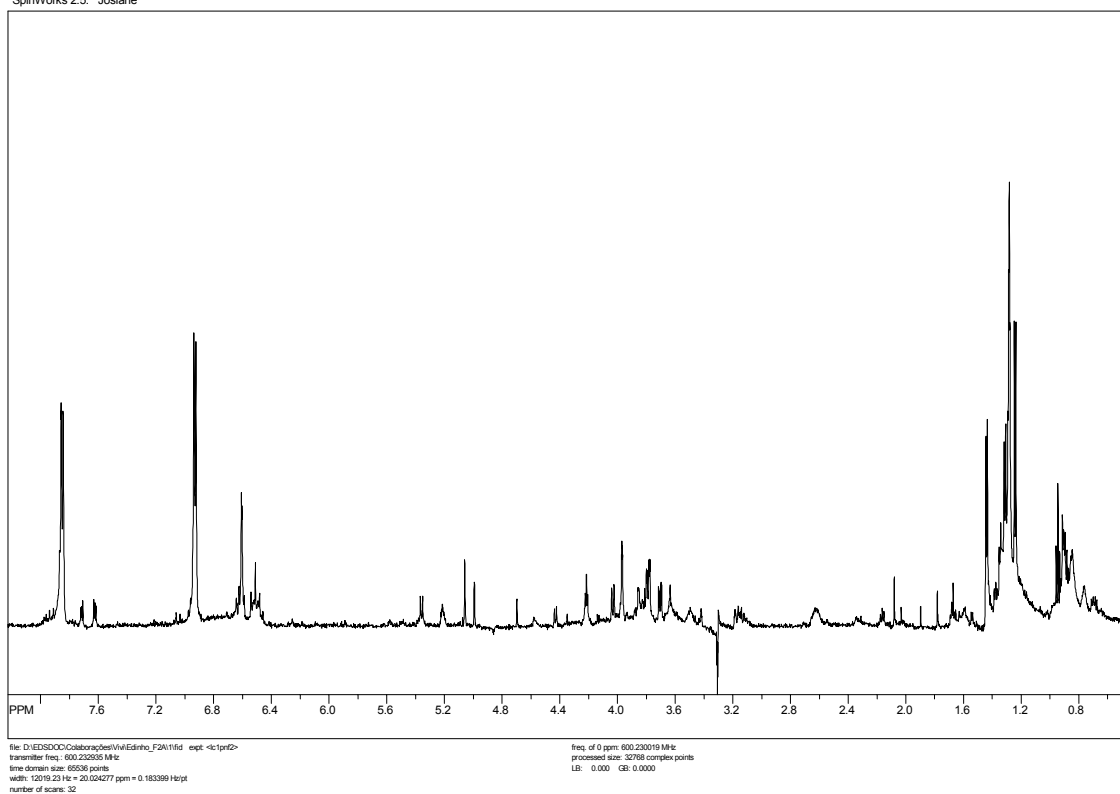
- ✓ Extratos aquosos de folhas jovens de *Serjania lethalis* não apresentaram diferenças significativas em relação às variáveis de germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Panicum maximum*, quando comparado com o efeito do extrato aquoso de folhas maduras;
- ✓ Frações provenientes de extratos etanólicos de folhas jovens de *Serjania lethalis* apresentaram-se mais fitotóxicas sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) do que frações provenientes de extratos etanólicos de folhas maduras.
- ✓ Foram isoladas e identificadas três procianidinas diméricas e procianidinas poliméricas (taninos condensados), sendo que uma procianidina apresentou dados espectroscópicos não encontrados na literatura.
- ✓ O crescimento de plântulas e células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*) é negativamente afetado por frações provenientes do extrato etanólico de folhas jovens.
- ✓ Quando submetidos à extração em fase sólida, folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis* apresentaram-se fitotóxicas sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*).

- ✓ *Serjania lethalis* é uma promissora fonte de herbicidas naturais e suas folhas jovens e raízes possuem substâncias que agem negativamente sobre o crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais.

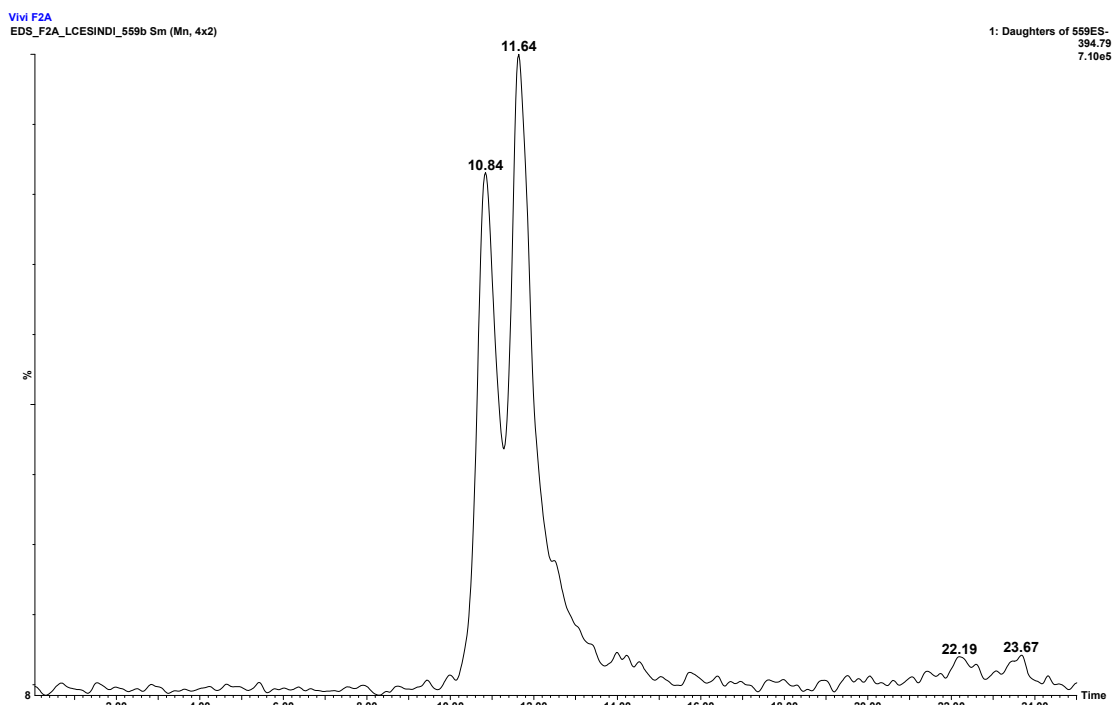
ANEXOS

Anexo A. Espectro de RMN- ¹H referente à sub-fração Fje2A

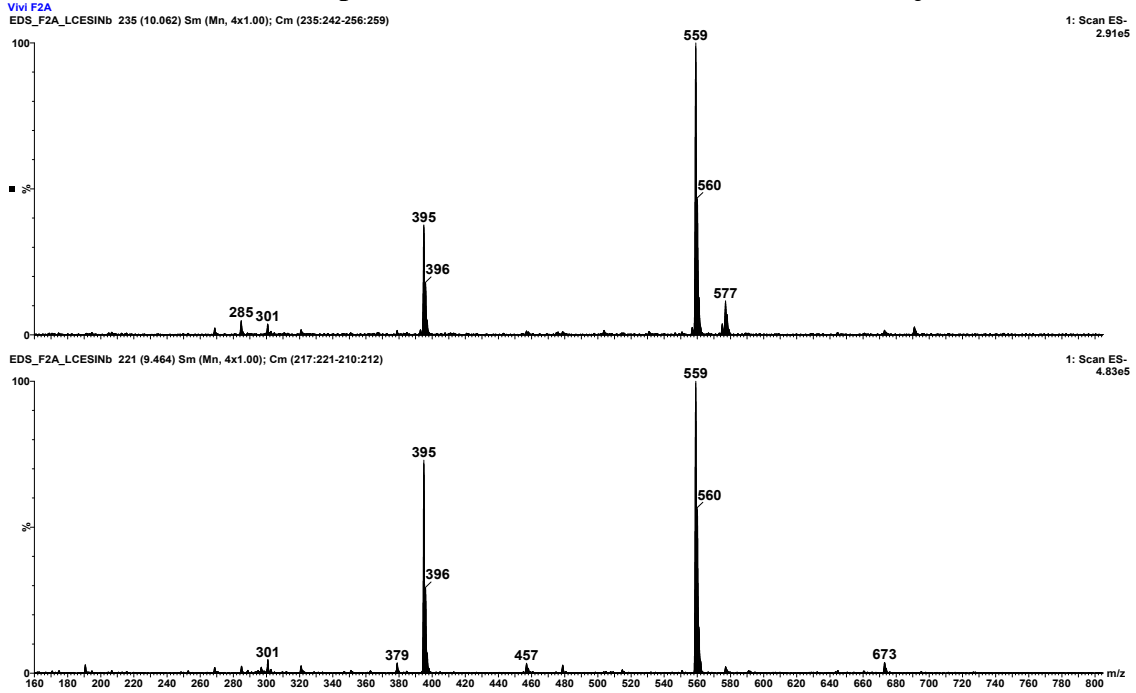
SpinWorks 2.5: Josiane



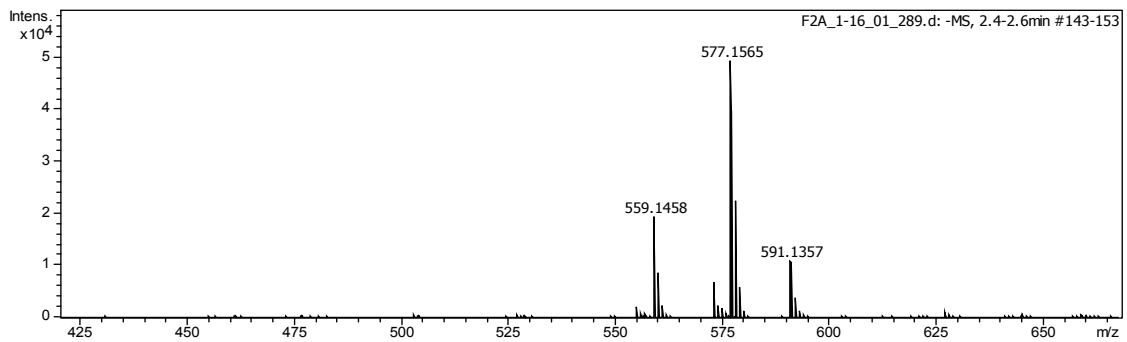
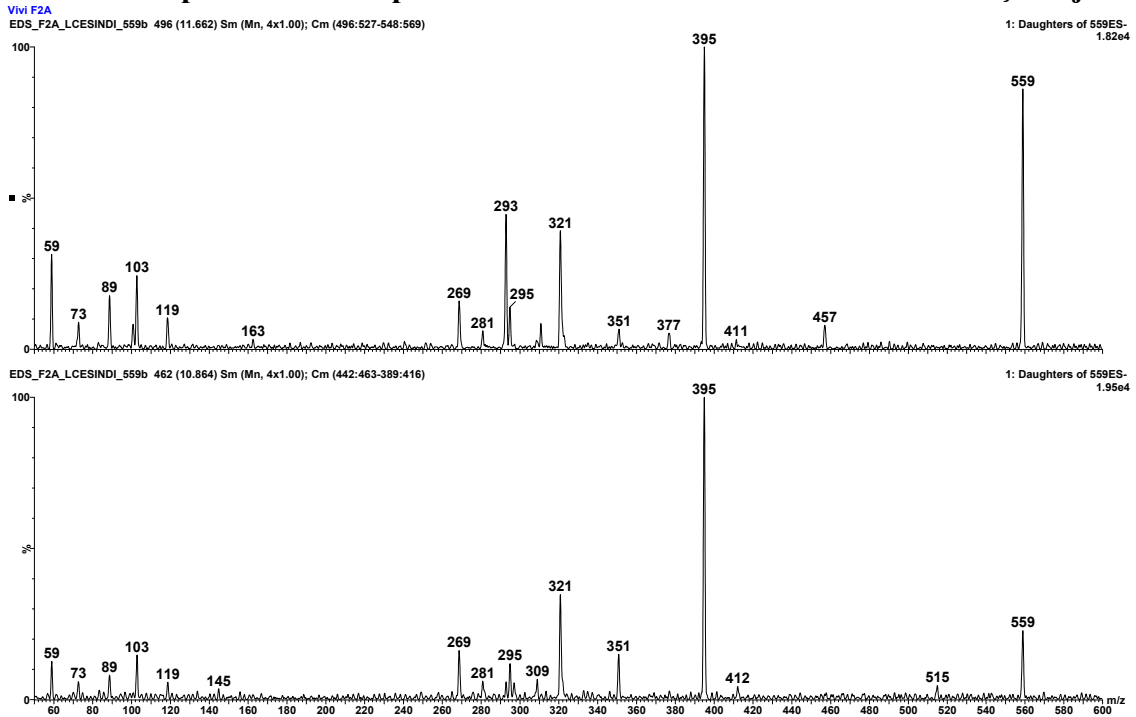
Anexo B. Cromatograma de íons produtos referente à sub-fração Fje2A

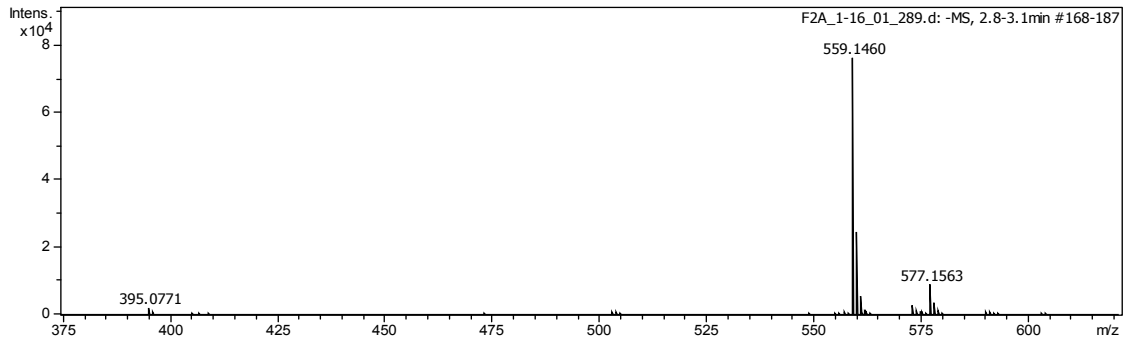


Anexo C. Espectros *Full Scan* referente à sub-fração Fje2A



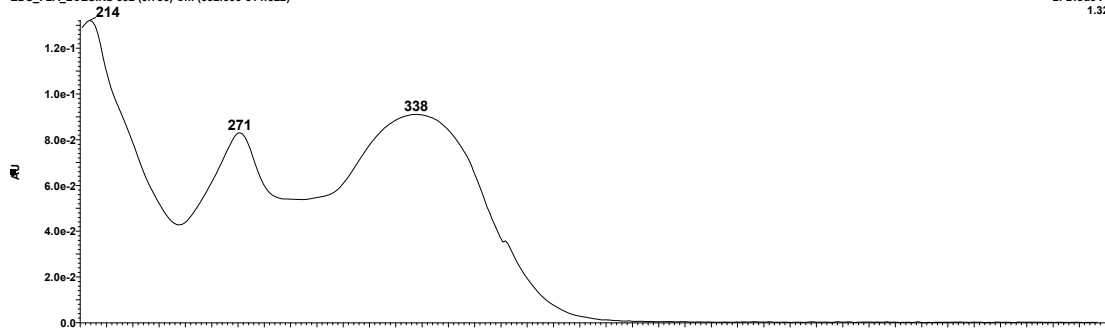
Anexo D. Espectros de íons produto referentes ao íon m/z 559 da sub-fração Fje2A



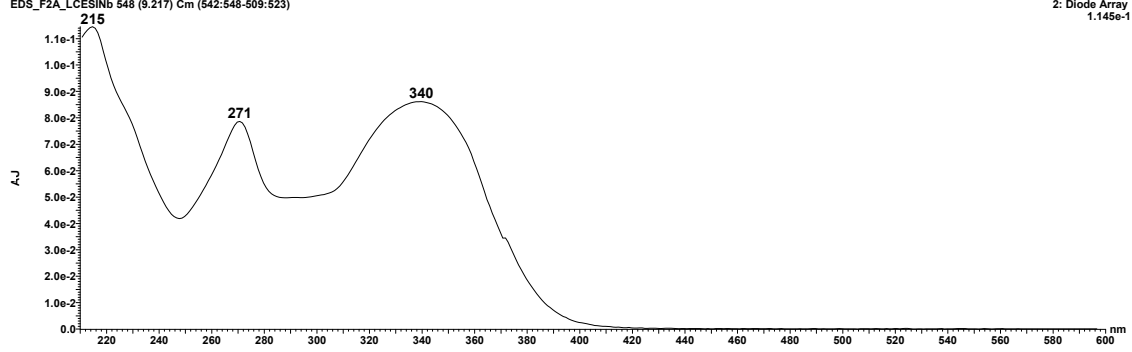


Anexo E. Espectros da região de Ultra-violeta referentes à sub-fração Fje2A

Vivi F2A
EDS_F2A_LCESINb 582 (9.783) Cm (582:593-514:522) 2: Diode Array 1.322e-1

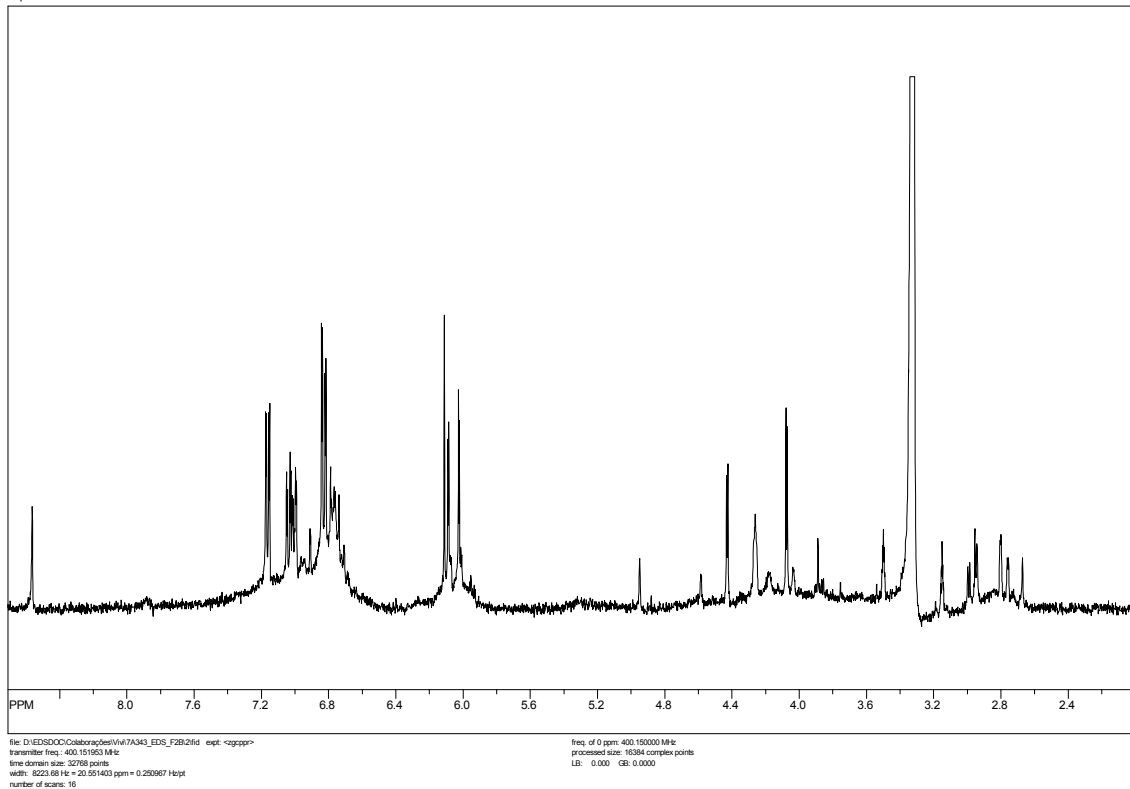


EDS_F2A_LCESINb 548 (9.217) Cm (542:548-509:523) 2: Diode Array 1.145e-1



Anexo F. Espectro de RMN-¹H referente à sub-fração Fje2B

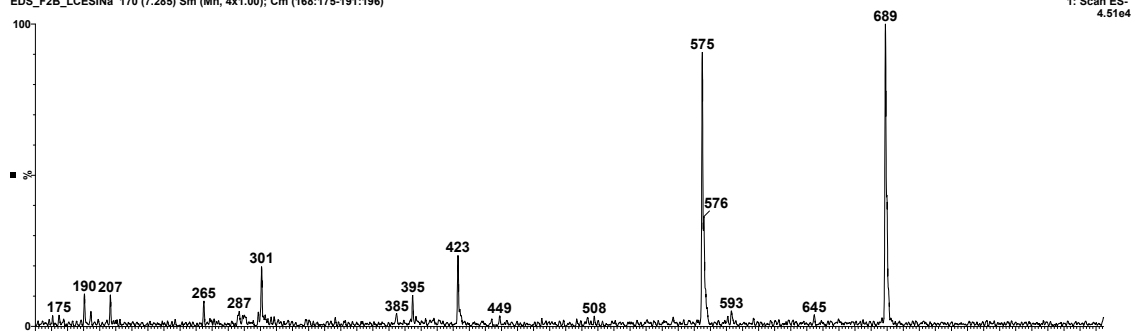
SpinWorks 2.5: ORIENTADOR EDINHO



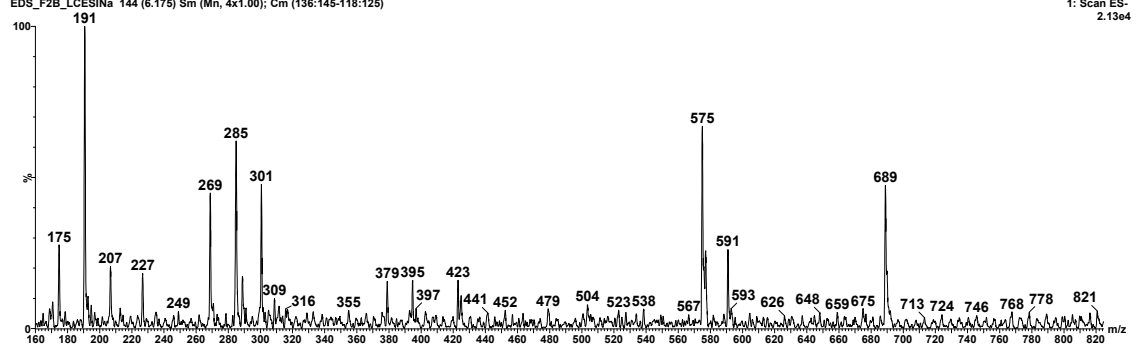
Anexo G. Espectros *Full Scan* referentes à sub-fração Fje2B

Vivi F2B

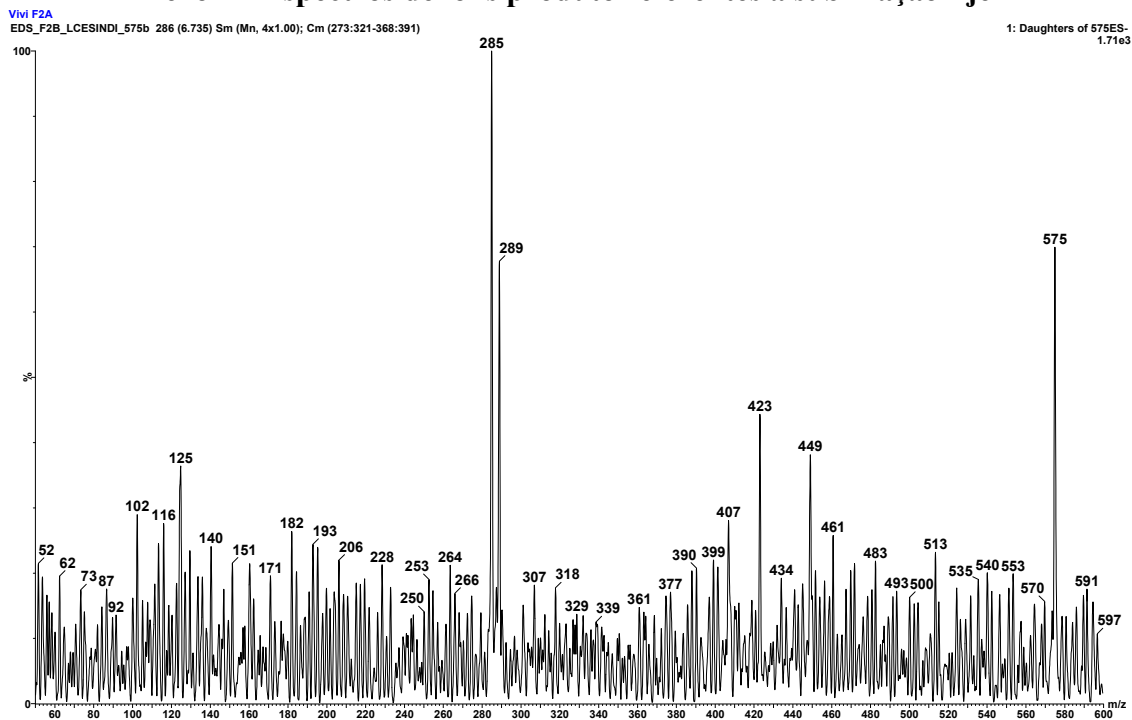
EDS_F2B_LCESiNa 170 (7.285) Sm (Mn, 4x1.00); Cm (168:175-191:196)



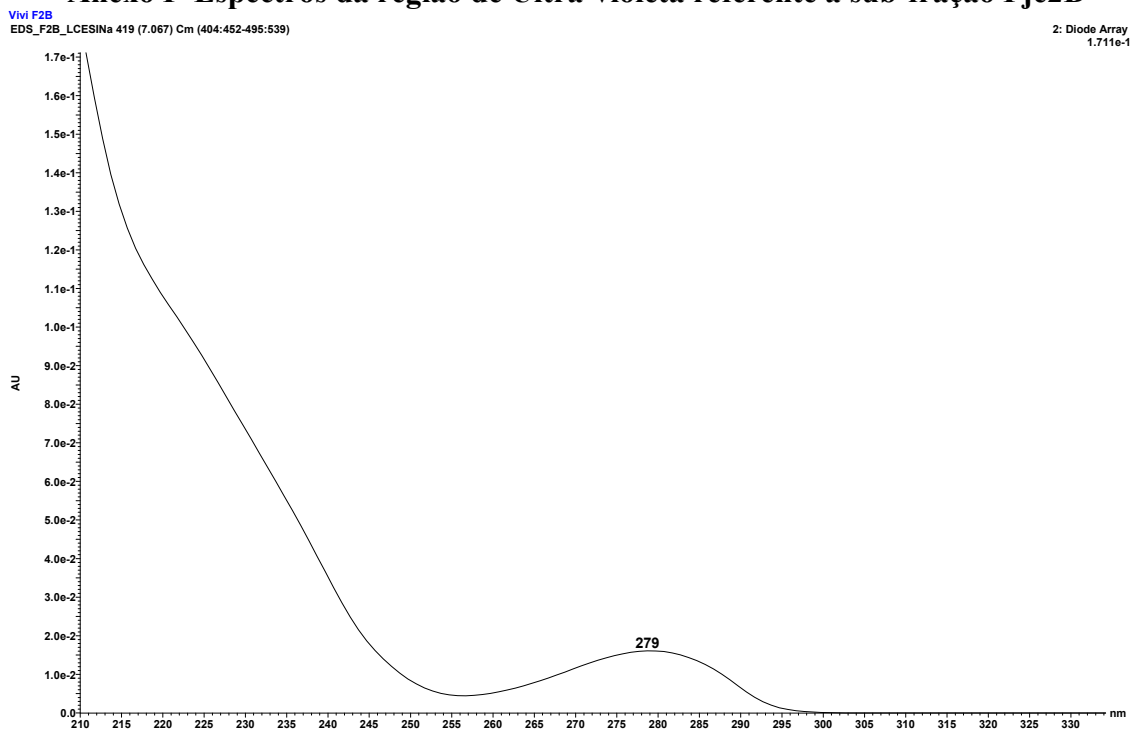
EDS_F2B_LCESiNa 144 (6.175) Sm (Mn, 4x1.00); Cm (136:145-118:125)



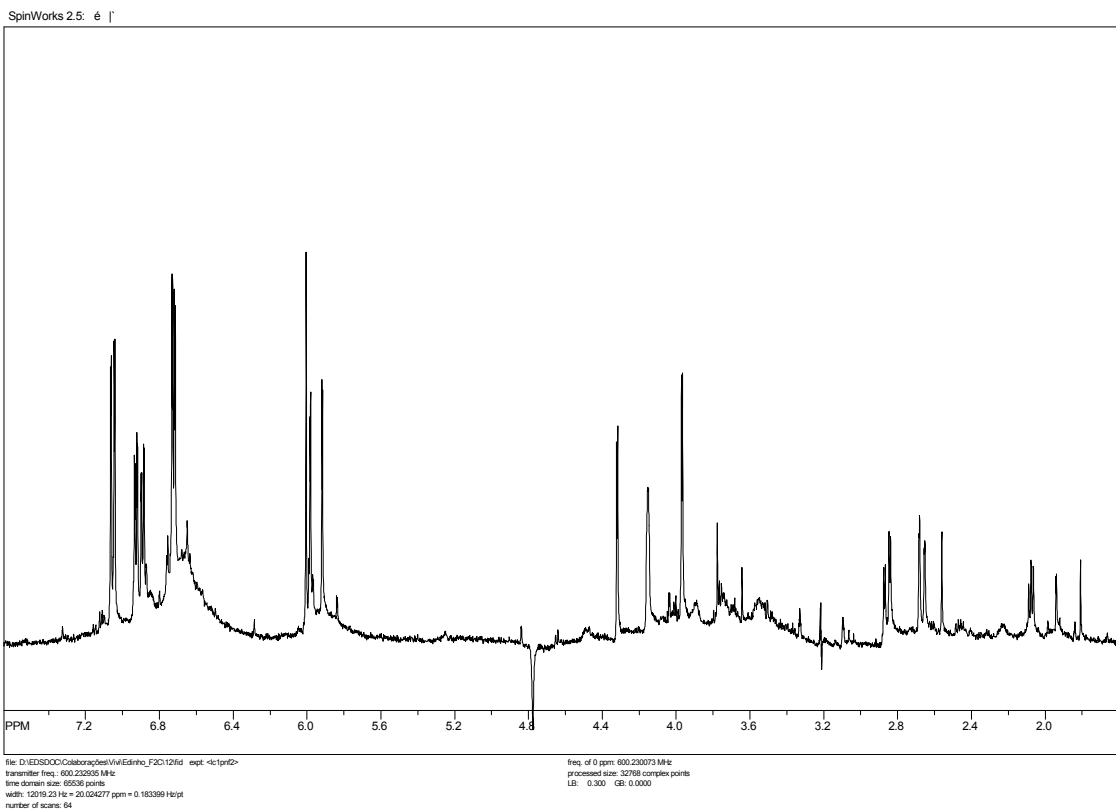
Anexo H- Espectros de íons produto referentes à sub-fração Fje2B



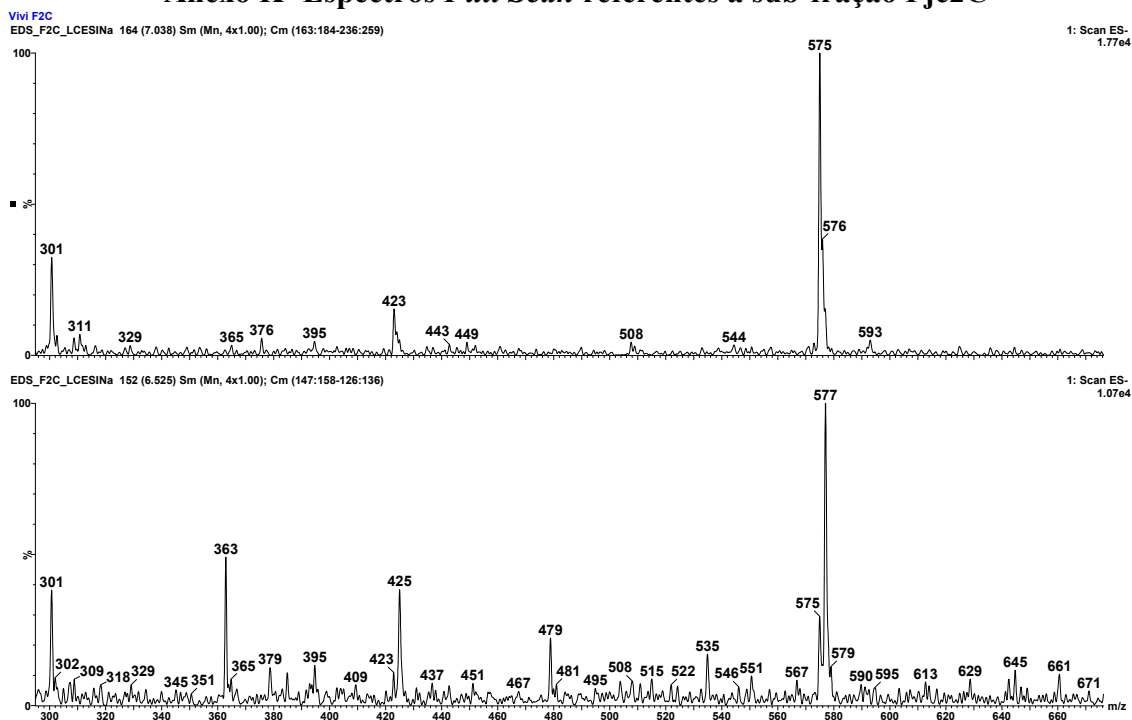
Anexo I- Espectros da região de Ultra-violeta referente à sub-fração Fje2B



Anexo J. Espectro de RMN- ¹H referente à sub-fração Fje2C



Anexo K- Espectros *Full Scan* referentes à sub-fração Fje2C

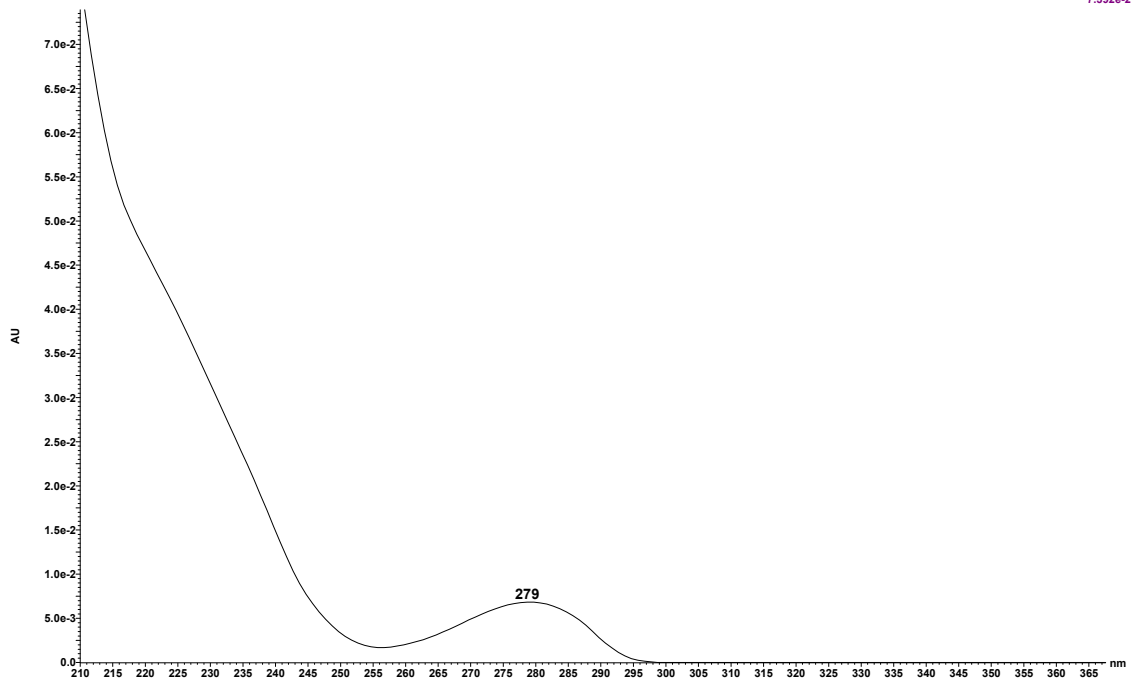


Anexo L- Especto da região de Ultra-Violeta referente à sub-fração Fje2C

Vivi F2C

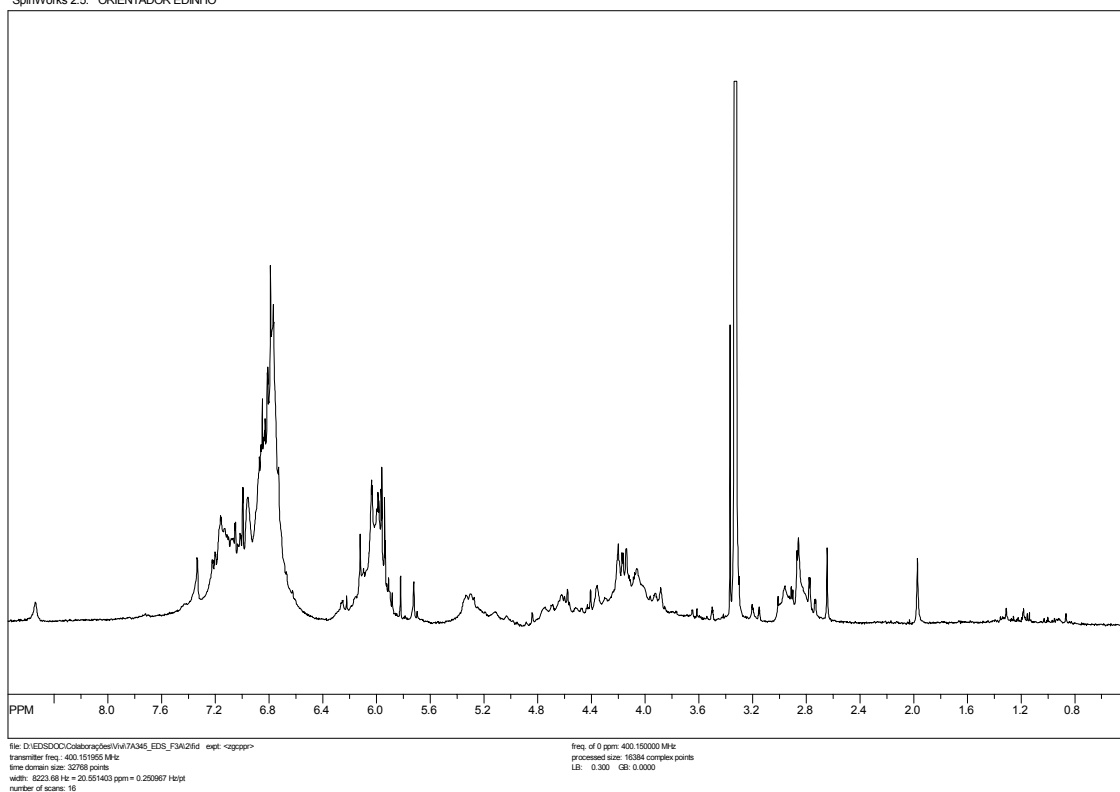
EDS_F2C_LCESiNa 411 (6.933) Cm (391:431-514:533)

2: Diode Array
7.392e-2

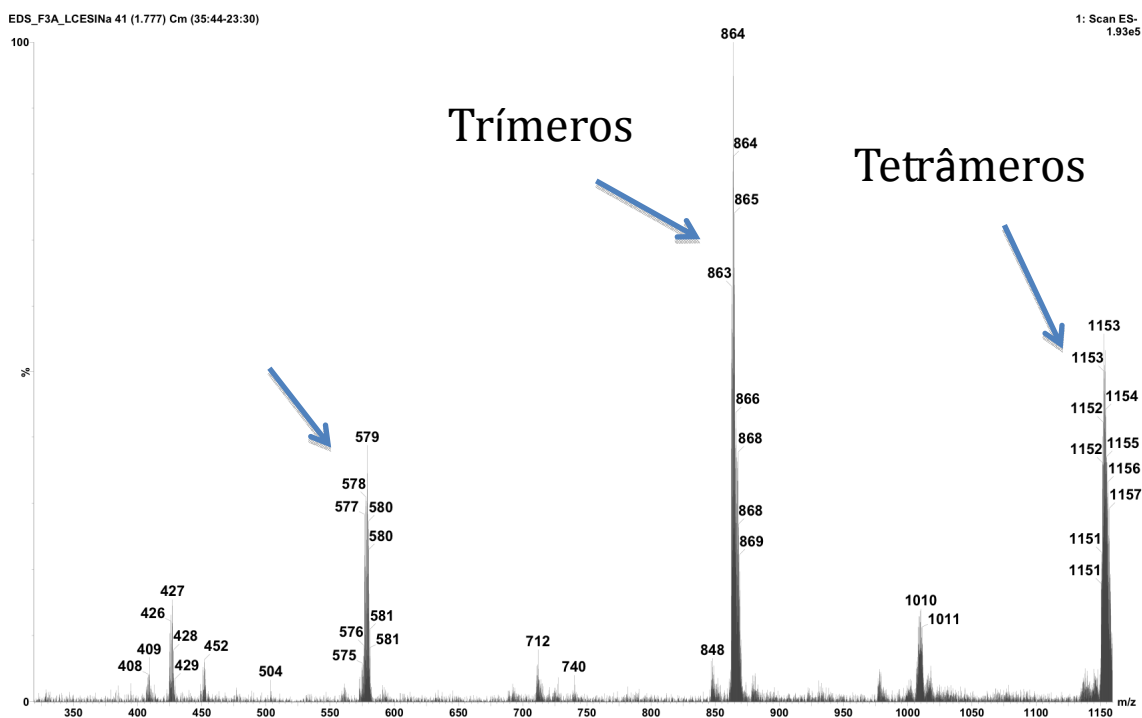


Anexo M- Espectro de RMN- ¹H referente à sub-fração Fje3A

SpinWorks 2.5: ORIENTADOR EDINHO



Anexo N- Espectro *Full Scan* referente à sub-fração Fje3A



Anexo O- Espectros *Full Scan* referentes à sub-fração Fje3A

