

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

**Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e identificação de metabólitos secundários**

**Patrícia Umeda Grisi**

São Carlos-SP  
2015

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

**Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e identificação de metabólitos secundários**

**Patrícia Umeda Grisi**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Cristina Juliano Gualtieri**

São Carlos-SP  
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

G869af Grisi, Patrícia Umeda.  
Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. e  
*Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e identificação de  
metabólitos secundários / Patrícia Umeda Grisi. -- São  
Carlos : UFSCar, 2015.  
200 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2015.

1. Alelopatia. 2. *Sapindus saponaria*. 3. *Serjania lethalis*.  
4. Plantas daninhas. 5. *Toxoptera citricidus*. I. Título.

CDD: 581.23 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Patrícia Umeda Grisi, realizada em 06/03/2015:

Prof. Dr. Sonia Cristina Juliano Gualtieri  
UFSCar

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar

Prof. Dr. Patricia Andrea Monquero  
UFSCar

Prof. Dr. Sarah Christina Caldas Oliveira  
UnB

Prof. Dr. Paula Novaes  
USP

*“Dedico este trabalho ao meu marido, Carlos, que sempre me apoiou e suportou minha ausência em diversos momentos para que esse trabalho pudesse ser realizado... meu amor e companheiro de vida.”*

*“Aos meus pais e ao meu irmão, a quem devo o amor pela vida... meu porto seguro.”*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, trilhar e conhecer um pouco sobre o caminho da Ciência e, principalmente, sobre os caminhos da vida.

Ao meu amado marido, Carlos, pela cumplicidade, afeto e carinho nesses anos. Tenho certeza que sem o seu incentivo e apoio, esse trabalho não teria sido realizado.

Aos meus pais, Rubens e Lumi, por sempre apoiarem minhas decisões e estarem ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo amor incondicional que vocês têm por mim e pela sábia educação com o qual me criaram.

Ao meu irmão, Bruno, pela grande amizade, carinho e por aguentar todos os meus desabafos.

À professora Sônia Cristina Juliano Gualtieri, pela orientação, por ter me dado a oportunidade e a liberdade de realizar este doutorado e principalmente pela confiança, apoio, carinho e atenção que sempre teve por mim.

Ao professor Moacir Rossi Forim, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo apoio, paciência e, principalmente pela contribuição nas análises fitoquímicas e por disponibilizar espaço, equipamentos e materiais para a realização do trabalho.

Ao Marcos Fernando Franco e professor Marcos Nogueira Eberlin, do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas - Instituto de Química da Unicamp, pelas análises de espectrometria de massas.

Ao professor Marcos Arduim pela disponibilização do Laboratório de Anatomia-UFSCar.

À professora Denise Garcia Santana, pela contribuição nas análises estatísticas.

Às alunas do DQ/UFSCar, Eveline Soares Costa, Fabiana Aparecida Marques e Karen Cristina dos Santos, por auxiliarem nos experimentos do estudo fitoquímico.

À Wanessa Gambarra pela amizade e auxílio no desenvolvimento dos experimentos com os insetos.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia de Sementes, Simoni Anese, Maristela Imatomi, Viviane Pereira, Maria Augusta Machado, Laffayette Pereira, Leandro Takao e Luciana Jatobá, pela colaboração e alegre convivência.

Às minhas queridas amigas que me acolheram por esses anos, Renata Martins, Lidiane Silva, Raquel Moreira e Natália Negreiros. Obrigada pelo carinho, atenção e amizade tão sincera.

Aos técnicos do Departamento de Botânica da UFSCar, Carlos Casali e Maristela Imatomi, pelo auxílio e ajuda nas coletas.

Às professoras que participaram do exame de qualificação, Maria Inês Salgueiro Lima, Andréia Pereira Matos e Maristela Imatomi, pelas valiosas sugestões e correções oferecidas.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões e correções oferecidas.

Ao CNPq (bolsa de estudo) e a CAPES (suporte financeiro).

## SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS.....	10
SUMÁRIO DE TABELAS.....	16
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	18
RESUMO GERAL.....	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO GERAL.....	23

### **CAPÍTULO I..... 54**

#### **"Influência de extratos aquosos de folha e caule de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. sobre diásporos e plântulas de diferentes espécies cultivadas"**

RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
1. Introdução.....	57
2. Material e Métodos.....	58
2.1. Preparação dos extratos.....	58
2.2. Potencial osmótico e pH dos extratos.....	59
2.3. Bioensaio de germinação.....	59
2.4. Bioensaio de crescimento de plântulas.....	61
2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema).....	62
2.6. Análise estatística.....	62
3. Resultados.....	63
3.1. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas.....	63
3.2. Estudo anatômico das raízes de gergelim (células do metaxilema).....	72
4. Discussão.....	74
5. Conclusão.....	77
6. Referências.....	77

### **CAPÍTULO II..... 84**

#### **"Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas"**

RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	85

1. Introdução .....	86
2. Material e Métodos .....	87
2.1. Preparação dos extratos.....	87
2.2. Bioensaio de germinação .....	88
2.3. Bioensaio de crescimento de plântulas .....	88
2.4. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) .....	89
2.5. Análise estatística.....	89
3. Resultados e Discussão .....	90
4. Conclusão.....	98
5. Referências.....	98

**CAPÍTULO III..... 102**

**"Avaliação fitotóxica dos extratos aquosos de folhas e cascas do caule de *Sapindus saponaria* L."**

RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	103
1. Introdução .....	104
2. Material e Métodos .....	106
2.1. Preparação dos extratos.....	106
2.2. Potencial osmótico e pH dos extratos .....	106
2.3. Bioensaio de germinação .....	107
2.4. Bioensaio de crescimento de plântulas .....	108
2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) .....	108
2.6. Análise estatística.....	109
3. Resultados .....	109
3.1. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas.....	109
3.2. Estudo anatômico das raízes de gergelim (células do metaxilema).....	118
4. Discussão .....	120
5. Conclusão.....	122
6. Referências.....	123

<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>128</b>
<b>"Fitotoxicidade e identificação de metabólitos secundários do extrato foliar de <i>Sapindus saponaria</i> L."</b>	
RESUMO .....	129
ABSTRACT .....	130
1. Introdução .....	131
2. Material e Métodos .....	132
2.1. Preparação das frações .....	132
2.2. Bioensaio de germinação .....	133
2.3. Bioensaio de crescimento de plântulas .....	133
2.4. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) .....	134
2.5. Fracionamento e identificação dos metabólitos secundários .....	134
2.6. Análise estatística .....	136
3. Resultados .....	137
4. Discussão .....	147
5. Conclusão .....	150
6. Referências .....	150
Informação Suplementar - Anexos .....	155
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>163</b>
<b>"Potencial pesticida dos extratos fracionados de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> L."</b>	
RESUMO .....	164
ABSTRACT .....	165
1. Introdução .....	166
2. Material e Métodos .....	168
2.1. Obtenção do material vegetal .....	168
2.2. Rota fitoquímica .....	168
2.2.1. Preparo do extrato etanólico e fracionamento .....	168
2.2.2. Fracionamento cromatográfico, purificação e identificação das substâncias .....	169
2.2.3. Extração em fase sólida (SPE) .....	170
2.3. Bioensaios .....	171
2.3.1. Bioensaio com coleóptilos de trigo .....	171
2.3.2. Bioensaio de toxicidade: adultos e ninfas de <i>T. citricidus</i> .....	172
3. Resultados e Discussão .....	173

3.1. Bioensaio com coleóptilos de trigo .....	173
3.2. Mortalidade de adultos e ninfas de <i>T. citricidus</i> .....	175
3.3. Fracionamentos e identificação dos metabólitos secundários.....	180
4. Conclusão.....	184
5. Referências.....	184
Informação Suplementar - Anexos .....	193
CONCLUSÃO GERAL.....	200

## SUMÁRIO DE FIGURAS

### Introdução geral

- Figura 1. *Sapindus saponaria* e seus respectivos frutos (Grisi, 2010)..... 37
- Figura 2. Estrutura da saponina e do OGSA isolados dos frutos de *Sapindus saponaria* (Murgu e Rodrigues Filho, 2006). ..... 38
- Figura 3. *Serjania lethalis* encontrada na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” da Universidade Federal de São Carlos (Pereira, 2014) e suas respectivas folhas. .... 40

### Capítulo I

- Figura 1. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de folha de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média..... 64
- Figura 2. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média..... 65
- Figura 3. Efeito dos extratos de folha de *Serjania lethalis*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*). ..... 66
- Figura 4. Efeito dos extratos de caule de *Serjania lethalis*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*). ..... 67
- Figura 5. Relação entre o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz em plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*), submetidas à ação dos extratos de folha (A) e caule (B) de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações (variável do eixo y em escala logarítmica)..... 68
- Figura 6. Anormalidades de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de folha (F) e caule (C) de *Serjania lethalis* nas concentrações 5% (1) e 10% (2). Escala = 1,0 cm. .... 69
- Figura 7. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folha e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. .... 72
- Figura 8. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do controle (A) e dos extratos de folha (B) e caule (C) de *Serjania lethalis* na concentração 10%. Escala = 50 $\mu\text{m}$ . .... 73

Figura 9. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	73
---	----

## Capítulo II

Figura 1. Germinabilidade (A), tempo médio (B), velocidade média (C) e velocidade de germinação de Maguire (D) das cariopses de capim-arroz submetidos à ação do extrato etanólico de folhas e caules de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	90
Figura 2. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz submetidos à ação do extrato etanólico de folhas (A) e caules (B) de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	91
Figura 3. Germinabilidade (A), tempo médio (B), velocidade média (C) e velocidade de germinação de Maguire (D) de sementes de amendoim-bravo submetidos à ação do extrato etanólico de folhas e caules de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	92
Figura 4. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidos à ação do extrato etanólico de folhas (A) e caules (B) de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	93
Figura 5. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do extrato etanólico de folhas e caules de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	95
Figura 6. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do extrato etanólico de folhas e caules de <i>Serjania lethalis</i> em diferentes concentrações. ....	96
Figura 7. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do controle (A) e do extrato etanólico de folhas (B) e caules (C) de <i>Serjania lethalis</i> , na concentração 10mg/mL. ....	97

## Capítulo III

Figura 1. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de sementes de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ), rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> ) e trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) submetidas à ação dos extratos de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média. ....	110
Figura 2. Efeito dos extratos de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> , em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ), rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> ) e trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ). ....	112
Figura 3. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de sementes de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ), rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> ) e trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) submetidas à ação dos	

extratos de cascas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.....	113
Figura 4. Efeito dos extratos de cascas de <i>Sapindus saponaria</i> , em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ), rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> ) e trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ). .....	114
Figura 5. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	118
Figura 6. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	119
Figura 7. Fotomicrografias das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do controle (A) e dos extratos de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> nas concentrações 2,5%(B), 5% (C), 7,5% (D) e 10% (E). Escala = 50 $\mu\text{m}$ . ....	119

#### Capítulo IV

Figura 1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados a partir do pó das folhas de <i>S. saponaria</i> , com os respectivos rendimentos. <sup>1</sup> Extração etanólica. <sup>2</sup> Partição líquido-líquido. <sup>3</sup> Cromatografia de coluna (sílica gel). ....	136
Figura 2. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média e velocidade de germinação de Maguire dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo submetidos à ação da fração hexânica de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	138
Figura 3. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação da fração hexânica de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	139
Figura 4. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média e velocidade de germinação de Maguire dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo submetidos à ação da fração acetato de etila de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	139
Figura 5. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação da fração acetato de etila de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	140
Figura 6. Plântulas anormais de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	140
Figura 7. Anormalidades identificadas nas plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> . Escala = 1,0 cm. ....	142
Figura 8. Principais anomalias encontradas nas plântulas anormais de amendoim-bravo submetidas à ação do herbicida e das frações de hexano e acetato de etila de folhas de <i>Sapindus</i>	

*saponaria*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as anomalias e minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade..... 142

Figura 9. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para frações e minúsculas para as concentrações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão..... 143

Figura 10. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do controle (a) e das frações de hexano (b) e acetato de etila (c) de folhas de *Sapindus saponaria* na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Escala =  $50\mu\text{m}$ ..... 143

Figura 11. Estrutura química do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico isolado e identificado da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*. ..... 144

Figura 12. Efeito inibitório das frações de hexano e acetato de etila, do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico (composto isolado) obtidos das folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida sobre a germinação e crescimento das plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b). Médias seguidas por letras iguais nos tratamentos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. (\*) Diferença significativa em relação ao controle..... 146

Figura 1S. **A)** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico; **B)** Ampliação entre 1,0 e 2,5 ppm..... 157

Figura 2S. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico. .... 158

Figura 3S. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico. .... 159

Figura 4S. Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico. .... 160

Figura 5S. Espectro de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico. .... 161

Figura 6S. Espectro de massas *Full-scan* ESI(+) e estrutura do composto isolado (ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico). .... 162

Figura 7S. Espectrometria de massas sequencial (MS/MS) do íon molecular  $m/z$  197.1165 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) e proposta de fragmentação, confirmando a estrutura molecular do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico. .... 162

## Capítulo V

Figura 1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados a partir do pó das folhas de *S. saponaria*, com os respectivos rendimentos. <sup>1</sup>Extração etanólica. <sup>2</sup>Partição líquido-líquido. <sup>3</sup>Cromatografia de coluna (sílica gel). <sup>4</sup>Extração em fase sólida (SPE). .... 169

- Figura 2. Efeito inibitório das frações de hexano (FH), acetato de etila (FAE), butanol (FB) e aquosa (FA) das folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida oxifluorfem sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Diferença significativa em relação ao controle negativo. .... 174
- Figura 3. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* submetidos à pulverização de diferentes concentrações da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria*, após 48 horas de exposição. .... 175
- Figura 4. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* submetidos à pulverização de diferentes concentrações da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*, após 48 horas de exposição. .... 176
- Figura 5. Mortalidade de adultos de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. .... 176
- Figura 6. Mortalidade de ninfas de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. .... 177
- Figura 7. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para o tempo de exposição e minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. .... 178
- Figura 8. Efeito inibitório das sub-frações da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida oxifluorfem sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Diferença significativa em relação ao controle negativo.
- Figura 9. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir das sub-frações F8D (V) e F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol caempferol. .... 181
- Figura 10. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol quercetina. .... 181
- Figura 11. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona. .... 182
- Figura 1S. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. .... 194
- Figura 2S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 5,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. .... 194

Figura 3S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	195
Figura 4S. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	195
Figura 5S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 2,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	196
Figura 6S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 0 e 3,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	196
Figura 7S. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	197
Figura 8S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 6,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	197
Figura 9S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	198
Figura 10S. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	198
Figura 11S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 4,0 e 8,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	199
Figura 12S. Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> .....	199

## SUMÁRIO DE TABELAS

### Capítulo I

- Tabela 1. Germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de folha e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações..... 70
- Tabela 2. Efeito dos extratos de folha e caule de *Serjania lethalis* na germinação de diásporos e no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*)..... 71

### Capítulo II

- Tabela 1. Germinação e crescimento de plântulas de amendoim-bravo e capim-arroz submetidas à ação do herbicida e do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis*. ..... 94

### Capítulo III

- Tabela 1. Efeito dos extratos de folhas e cascas de *Sapindus saponaria* na germinação de diásporos e no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*)..... 116
- Tabela 2. Germinação de diásporos e crescimento das plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de folha e casca de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações..... 117

### Capítulo IV

- Tabela 1. Plântulas anormais de capim-arroz e amendoim-bravo submetidas à ação do herbicida e das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* e, suas principais anomalias. .... 141
- Tabela 2. Efeito do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, isolado a partir da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*, sobre a germinação e crescimento de plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo..... 145
- Tabela 1S. Dados de RMN 1D e 2D referentes ao ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico..... 156

### Capítulo V

- Tabela 1. Produtos obtidos na extração em fase sólida (SPE) a partir das sub-frações oriundas da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*..... 170

Tabela 2. Comprimento médio dos coleóptilos de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) submetidos à ação do herbicida e das frações do extrato etanólico de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	173
Tabela 3. Coeficiente angular, concentração letal (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> , em mg mL <sup>-1</sup> ) e intervalo de confiança das frações de hexano e acetato de etila de folhas de <i>Sapindus saponaria</i> para adultos e ninfas de <i>Toxoptera citricidus</i> após 48 horas de aplicação das soluções. ....	179
Tabela 4. Comprimento médio dos coleóptilos de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) submetidos à ação do herbicida e das sub-frações da fração hexânica das folhas de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações. ....	181

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- AcOEt – Acetato de etila
- OGSA – Oligoglicosídeos de sesquiterpenos acíclicos
- ACN – Acetonitrila
- B.O.D. – *Biochemical oxygen demand*
- CCD – Cromatografia de camada delgada
- $\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio deuterado
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – Diclorometano
- COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  – *Correlation spectroscopy*
- Da – Dalton
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EM – Espectrometria de massas
- ESI – *Electrospray*
- HMBC – *Heteronuclear multiple-bond correlation*
- HSQC – *Heteronuclear single quantum coherence*
- Hz – Hertz
- LC – Cromatografia líquida
- LC MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
- LC MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas sequencial
- MeOH - Metanol
- MES – Ácido 2-[N-morfolino]- etanossulfônico
- MHz – Mega Hertz
- MS – *Mass spectrometry*
- $m/z$  – Razão massa/carga
- ppm – Partes por milhão
- RMN– Ressonância magnética nuclear
- RMN- $^1\text{H}$  - Ressonância magnética nuclear do hidrogênio
- RMN- $^{13}\text{C}$  – Ressonância magnética nuclear do carbono
- TFA – Ácido trifluoroacético
- UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*
- $\delta$  – Deslocamento químico

## RESUMO GERAL

A organização e dinâmica de uma comunidade são determinadas, entre outros fatores, pelo balanço das interações positivas e negativas das espécies. A investigação de plantas com atividade alelopática vem de encontro com a necessidade de se apresentar novas alternativas no manejo de pragas agrícolas. As espécies da família Sapindaceae são uma fonte rica de fitoquímicos e possuem um imenso potencial para a produção de compostos secundários com atividade biopesticida. Assim, este trabalho tentou esclarecer as seguintes questões: (1) os extratos de folhas e caules/cascas de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. e *Sapindus saponaria* L. poderiam interferir no processo de germinação dos diásporos e crescimento das plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.)? (2) Além disso, esses extratos poderiam afetar o desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), possibilitando, assim, o controle destas espécies daninhas? (3) Os extratos fracionados de *S. saponaria* poderiam apresentar atividade inseticida sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae)? (4) Dentre os extratos ativos, qual o mais promissor para se iniciar uma bioprospecção, permitindo isolar e identificar os compostos presentes? Para responder essas perguntas foram realizados bioensaios com extratos brutos aquosos ou etanólicos (2,5; 5,0; 7,5 e 10%, m/v) e, posteriormente, testes com extrato fracionado por partição líquido-líquido utilizando hexano, acetato de etila (AcOEt) e butanol. Os extratos de folha e caule/cascas do caule de *S. lethalis* e *S. saponaria* foram fitotóxicos e inibiram o processo de germinação e o crescimento das plântulas de espécies cultivadas e daninhas, com efeito dependente da concentração. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que, na maioria dos casos, o extrato foliar apresentou maior atividade inibitória. Para algumas variáveis, esse efeito foi similar e até mesmo superior ao do herbicida comercial. Um dos modos de ação observado foi no crescimento radicular das plântulas de gergelim e amendoim-bravo, em que os extratos ocasionaram uma diminuição significativa no alongamento das células do metaxilema. A fração AcOEt proveniente do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* apresentou efeito inibitório superior ao da fração hexânica sobre o desenvolvimento das plântulas de capim arroz e amendoim-bravo. O estudo fitoquímico dessa fração resultou no isolamento do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, um ácido monoterpreno com características espectroscópicas não conhecidas na literatura. Esse composto também inibiu a germinação e o crescimento das espécies daninhas; porém, a fração AcOEt atuou com mais intensidade na redução do crescimento dessas plântulas. Por outro lado, a fração hexânica oriunda do extrato etanólico de folhas de *S. saponaria* apresentou efeito fitotóxico sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo e ocasionou elevada mortalidade sobre ninfas e

adultos de *T. citricidus*. As principais substâncias identificadas nessa fração foram os flavonóis derivados do caempferol e quercetina e, estes podem estar envolvidos na atividade biológica observada. Assim, *S. saponaria* pode ser uma espécie doadora de compostos com potencial inseticida e herbicida, sendo uma boa candidata para o fornecimento de aleloquímicos para uso futuro na agricultura.

**Palavras-chave:** alelopatia, germinação, crescimento, fitotoxinas, flavonóides, sabão-de-soldado, cipó-timbó, plantas daninhas, *Toxoptera citricidus*.

## ABSTRACT

### PHYTOTOXIC ACTIVITY *Serjania lethalis* A. St.-Hil. AND *Sapindus saponaria* L. (SAPINDACEAE) AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES

The organization and dynamic of community are determined, among other factors, by the balance of positive and negative interactions of species. Research of plants with allelopathic activity comes from the need to introduce new alternatives in the management of agricultural pests. Species of Sapindaceae family are rich source of phytochemicals and have a huge potential for the production of secondary compounds with biopesticide activity. This study attempted to clarify the following issues: (1) leaves and stems/bark extracts of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. and *Sapindus saponaria* L. could interfere in the diaspores germination and seedling growth of sesame (*Sesamum indicum* L.), radish (*Raphanus sativus* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.)? (2) In addition, these extracts could affect the development of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), allowing thus the control of these weeds? (3) The fractionated extracts from *S. saponaria* could present insecticidal activity against the mortality of *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae) adults and nymphs? (4) Among the active extracts, which is most promising for start a bioprospecting, allowing isolate and identify the compounds present? To answer these questions bioassays were performed with ethanol or aqueous crude extract (2.5, 5.0, 7.5 and 10%, w/v) and tested with fractionated extract by liquid-liquid partition using hexane, ethyl acetate (EtOAc) and butanol. Leaf and stem/stem bark extracts of *S. lethalis* and *S. saponaria* were phytotoxic and inhibited the process of germination and seedling growth of weeds and cultivated species, showing concentration-dependent effect. The phytotoxic effect of the extracts ranged according to the receptor species, and, in most cases, the leaf extract showed greater inhibitory activity. For some variables, this effect was similar and even superior to commercial herbicide. One of the action modes was observed in root growth of sesame and wild poinsettia seedlings, wherein the extract caused a significant decrease in elongation of metaxylem cells. The EtOAc fraction from the ethanol extract of *S. saponaria* leaves showed inhibitory effect greater than the hexane fraction on the development of barnyardgrass and wild poinsettia seedlings. The phytochemical study of this fraction resulted in the isolation of 3-(1,2-dimethyl-5-oxabicyclo [2.1.1] hexan-2-yl) but-2-enoic acid, a monoterpene acid with spectroscopic characteristics not known in the literature. This compound also inhibited the germination and growth of weeds; however, the EtOAc fraction was more active in reducing seedlings growth. The hexane fraction from the ethanol extract of *S. saponaria* leaves showed phytotoxic effect on elongation of wheat coleoptile and caused high mortality of *T. citricidus* nymphs and adults. The main substances

identified in this fraction were flavonols derivative of kaempferol and quercetin, and these may be involved in the biological activity observed. Thus, *S. saponaria* may be a donor species of compound with insecticide and herbicide potential, and a good candidate to supply allelochemicals for future use in agriculture.

**Keywords:** allelopathy, germination, growth, phytotoxins, flavonóides, soapberry, cipó-timbó, weed, *Toxoptera citricidus*.

## INTRODUÇÃO GERAL

Durante muitos anos, a competição foi o processo que norteou o desenvolvimento de teorias sobre a organização das comunidades vegetais (Goldberg e Barton, 1992; Souza, 2007). Entretanto, particularmente na última década, alguns autores voltaram a chamar a atenção para o papel das interações entre plantas como um importante evento na dinâmica da sucessão ecológica (Loertie, et al., 2004; Michalet et al., 2006). Às interações que se desencadeiam nas comunidades, Müller (1966) nomeou de interferências. Esse termo é muito amplo e engloba vários mecanismos que são diferenciados em alelospolia, alelopatia e alelomeiação (Szczepanski, 1977). Alelospolia foi definida como sendo a interferência promovida pela competição por fatores essenciais à sobrevivência das espécies, como água, nutrientes e espaço físico; alelopatia, como a alteração provocada pela liberação de substâncias químicas elaboradas por certos indivíduos, e que afetam determinados elementos da comunidade; e, alelomeiação ou interferência indireta, como os efeitos que alteram o ambiente físico ou biológico, com reflexos nos seres vivos (Souza Filho e Alves, 1998; Souza Filho, 2014).

Apesar de ser um fenômeno observado e descrito por diferentes culturas ao longo de mais de dois mil anos, o termo alelopatia foi cunhado pela primeira vez apenas em 1937, pelo fisiologista vegetal austríaco Hans Molisch, significando do grego *allelon* = mútuo e *pathos* = dano (Chou, 2006; Willis, 2007). Desde então, muitos outros pesquisadores se dedicaram a aperfeiçoar a definição do termo. Rice (1984) definiu alelopatia como qualquer efeito, direto ou indireto, benéfico ou nocivo, de uma planta sobre a outra através da produção e liberação de substâncias químicas para o ambiente. Em 1999, Rizvi et al. ampliaram a abrangência do conceito, definindo o fenômeno como a influência de uma planta sobre outro organismo, prejudicando ou favorecendo-o, por meio de biomoléculas denominadas aleloquímicos. Atualmente, a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu a alelopatia como a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (International Allelopathy Society, 2014).

A partir destas definições, no caso das interações planta-planta, reconhece-se uma planta doadora, aquela que produz e libera os aleloquímicos, e um organismo alvo, que sofre seus efeitos (Rizvi et al., 1999; Inderjit e Duke, 2003; Scognamiglio et al., 2014). Segundo Gottlieb (1982), os aleloquímicos são sinais químicos transmitidos ao ambiente, geralmente em pequena quantidade, e são responsáveis pelas múltiplas interações químicas entre os diferentes organismos. As interações positivas (promoção, atração) e negativas (inibição, repelência) indicam as funções ecológicas dessas substâncias, importantíssimas para a sobrevivência, evolução e co-evolução das espécies

vegetais e animais. Assim, a vegetação de uma determinada área pode ter um modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas que elas liberam no meio (Hierro e Callaway, 2003). Da mesma forma, no manejo agrícola, florestal e na horticultura, a ocupação prévia de uma área pode ter significativa influência sobre os cultivos que serão instalados (Batish et al., 2001; Singh et al., 2001; Baratelli, 2006).

No entanto, a interação alelopática pode ser considerada elucidada somente quando as seguintes evidências estiverem disponíveis: 1) existência de substâncias químicas (ou suas misturas) capaz de influenciar o desempenho de outra planta; 2) observação de que os metabólitos são realmente liberados no solo e podem de alguma forma atingir a planta receptora; e 3) quando os possíveis modos de ação e mecanismos moleculares envolvidos forem estabelecidos (Scognamiglio et al., 2014).

### **Metabólitos secundários em plantas**

As plantas produzem muitos compostos orgânicos que não parecem ter relação direta com o crescimento e desenvolvimento vegetal, denominados metabólitos secundários (Raven et al., 2010; Taiz e Zeiger, 2013). Esses compostos podem proteger a planta contra a herbivoria e infecções por fitopatógenos, agir como atrativos aos polinizadores e dispersores, além de atuarem na competição planta-planta e na simbiose planta-microrganismo (Larcher, 2000; Oliveros-Bastidas, 2008; Raven et al., 2010). Os metabólitos secundários são ativados a partir de estímulos, internos ou externos, sendo resultado de uma série de eventos coordenados a nível celular por um complexo de sinais (sinalizadores - “signaling”), onde a comunicação entre os órgãos é estabelecida por “mensageiros químicos” chamados hormônios ou fitormônios (Hinojosa, 2005).

Os vegetais produzem, estocam e em seguida, liberam para o ambiente um grande número de produtos do metabolismo secundário com propriedades biológicas específicas. No entanto, não se conhece com exatidão como eles são formados na célula (Souza Filho, 2014). Alguns autores acreditam que os produtos secundários das plantas são biossintetizados em organelas celulares e estocados em estruturas secretoras especializadas (vacúolos, parede celular, superfícies cerosas), com a finalidade de proteger os processos metabólicos da planta de seus efeitos tóxicos (Putnam e Duke, 1978; Souza Filho e Alves, 1998; Souza Filho, 2014). Essas estruturas estão geralmente localizadas em áreas onde poderiam, provavelmente, ser efetivas na defesa de vários órgãos, por exemplo, superfície das folhas, frutos, próximo da epiderme, colmos primários, etc. (Gershenzon e Croteau, 1991; Gershenzon, 1993). Entretanto, outros autores ressaltam que esses compostos secundários são continuamente sintetizados e degradados na célula com finalidades específicas, e

que sua síntese obedece a certos preceitos genéticos (Barz e Horsel; 1975; Souza Filho e Alves, 1998).

Os metabólitos secundários derivados do metabolismo da glicose via ácido chiquímico e acetato, são usualmente divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz e Zeiger, 2013).

### *Terpenos*

O terpeno é a maior classe de metabólitos secundários existentes nas plantas. Mais de 22.000 estruturas individuais já foram identificadas e, muitas delas, são relatadas por apresentarem um papel importante nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (Cheng et al., 2007; Zwenger e Basu, 2008).

Os terpenos geralmente são substâncias hidrofóbicas, produzidas em tecidos vegetativos, flores e, ocasionalmente, em raízes. São armazenados em dutos de resina, células oleaginosas e tricomas glandulares (Dudareva et al., 2004; Wink, 2010). Sua síntese ocorre a partir de acetil CoA (rota do ácido mevalônico) ou de moléculas glicosídicas como o piruvato e o 3-fosfoglicerato (rota do metileritritol fosfato ou MEP) (Dewick, 2002). Os terpenos são formados a partir da união de unidades de isopreno ( $C_5$ ) e, portanto, são classificados pela quantidade de unidades  $C_5$  que apresentam. Os terpenos contendo dez carbonos são chamados de monoterpenos, os com 15 carbonos são sesquiterpenos, e os com 20 carbonos são diterpenos. Compostos com 30 ou 40 carbonos são denominados triterpenos e tetraterpenos, respectivamente e, os com mais de 40 carbonos são nominados de politerpenóides (Zwenger e Basu, 2008).

Alguns terpenos têm papel importante no desenvolvimento vegetativo de plantas, podendo ser considerados metabólitos primários. Exemplos destes tipos de terpenos são as giberilinas, os esteróides de membrana celular, os carotenóides e o ácido abscísico. Como metabólitos secundários, os terpenos podem ser alelopáticos (Duke e Oliva, 2004), inseticidas e repelentes contra insetos (como os piretróides e os óleos essenciais, misturas de monoterpenos e sesquiterpenos, mentol e limoneno) (Viegas Júnior, 2003) e agentes contra infecções de patógenos como, por exemplo, as saponinas que agem como detergentes rompendo as membranas de fungos e bactérias patogênicas (Yang et al., 2006).

O efeito endógeno de terpenóides sobre o metabolismo de plantas pode incluir efeitos benéficos ou prejudiciais, dependendo de sua concentração nos tecidos. Em relação aos efeitos benéficos, por exemplo, podem induzir termotolerância (Delfine et al., 2000), resistência contra patógenos (Godard et al., 2008) ou, em baixas concentrações, podem liberar da dormência (Rentzsch et al., 2012). Em relação aos efeitos deletérios, eles podem atuar em processos fisiológicos e celulares, causando inibição da fotossíntese (Poonpaiboonpipat et al., 2013), inibição

da divisão celular, espessamento da parede celular, redução da comunicação intracelular, inibição da formação de raízes laterais (Granã et al., 2013a), peroxidação e perda de integridade de membranas (Chowhan et al., 2013), interferência na ação de fitormônios (Rahman et al., 2001) e danos ultraestruturais em células de raízes (Yang et al., 2011). Trabalhos recentes destacam que diferentes categorias de terpenos podem inibir a germinação e crescimento de outras plantas, particularmente plantas daninhas e, assim, apresentam-se promissores para serem usados como herbicidas naturais (Dayan et al., 2009; Abdelgaleil, et al., 2009; Macías et al., 2010; Granã et al., 2013b).

### *Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos ou fenóis possuem um anel aromático com um grupo hidroxila funcionalizado (Waterman e Mole, 1994). Sua síntese pode ocorrer a partir de Fenilalanina (rota do ácido chiquímico) ou Acetil CoA (rota do ácido mevalônico) (Smith, 1976). A rota do ácido chiquímico, a mais comum nos vegetais, transforma fenilalanina em ácido cinâmico, liberando amônia. Esta reação é catalisada pela PAL (fenilalanina amônia liase) e é influenciada por fatores ambientais como a presença de nutrientes no solo, temperatura e luz (Castro et al., 2005). Essas substâncias agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico (lignina), atração de polinizadores (carotenos), proteção contra radiação ultravioleta ou na redução do crescimento de plantas competidoras (Taiz e Zeiger, 2013).

Entre os compostos fenólicos mais importantes estão os derivados de ácido benzóico, ácido cafeico e outros fenilpropanóides simples, cumarinas, ligninas, taninos e flavonóides (Larcher, 2000). Diversos autores descrevem a atividade fitotóxica para os derivados do ácido benzóico, ácido cafeico, fenilpropanóides simples e cumarinas (Einhellig, 2004). Os taninos, hidrolisáveis ou condensados, também podem ser alelopáticos (Einhellig, 2004) e comumente inseticidas e repelentes, pois costumam formar complexos protéicos difíceis de serem digeridos por herbívoros (Taiz e Zeiger, 2013).

O flavonóide é a maior classe de compostos fenólicos existentes. Eles são derivados da rota do ácido chiquímico e do ácido mevalônico (Lima et al., 2004). São constituídos de um esqueleto de 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos (Imatomi et al., 2013). O interesse pelos flavonóides tem aumentado recentemente devido a sua gama de efeitos farmacológicos, explicado pela sua capacidade de inibir a atividade de algumas enzimas e pela sua atividade antioxidante (Saldanha, 2013). Os flavonóides são categorizados em antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonóis e isoflavonas. As flavonas e flavonóis, geralmente, absorvem luz em comprimentos de UV, podendo funcionar como atrativos aos polinizadores e protetores de tecidos contra excesso de radiação (Ferreira et al., 2008); também, são descritos como

alelopáticos, mediadores da interação planta-bactérias simbiotes e do desenvolvimento de vegetais competidores (Einhellig, 2004; Weston e Mathesius, 2013). As isoflavonas são descritas como inseticidas e como repositores de estrogênio humano (Esteves e Monteiro, 2001).

### *Compostos nitrogenados*

Os compostos nitrogenados de metabolismo secundário são os alcalóides, os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos e os aminoácidos não-protéicos (Taiz e Zeiger, 2013). Os alcalóides são bastante comuns nos vegetais. Eles possuem um átomo de nitrogênio em um ou mais anéis heterocíclicos de carbono e é sintetizado a partir de aminoácidos comuns como lisina, tiamina e triptofano, e outro aminoácido oriundo da rota do terpeno (Larcher, 2000; Taiz e Zeiger, 2013). São alcalinos e solúveis em água. Muitos apresentam ação contra herbívoros como, por exemplo, a nicotina e estricnina, ou são fármacos importantes tais como a morfina, cocaína, codeína, escapolamina (Blum, 2004).

A literatura descreve ainda os alcalóides quinolínicos, indólicos e esteroidais como substâncias alelopáticas (Baratelli, 2006). O efeito fitotóxico destas substâncias está associado a interferências na atividade enzimática, interações com o DNA e influência sobre a glicólise. As plantas que produzem estas substâncias possuem mecanismos de regulação biossintéticos especiais para evitar a autotoxicidade; no entanto, as suas sementes não resistem quando expostas diretamente a estes compostos (Aerts et al., 1991). Fukuhara e Kubo (1991) também descreveram dois alcalóides esteroidais, solamargina e solasonina, obtidos a partir dos frutos de *Solanum incanum* L. como as substâncias responsáveis pela atividade alelopática desta espécie.

Já, os glicosídeos cianogênicos protegem as plantas contra a predação, uma vez que são convertidos em ácido cianídrico no trato digestório dos herbívoros (Vetter, 2000). Esse composto está presente, por exemplo, em mandiocas selvagens. Os glucosinolatos liberam em sua decomposição, substâncias de defesa vegetal, característica do odor de brassicáceas como o repolho, brócolis e rabanete, e essas substâncias agem como toxinas e repelentes contra herbívoros (Thuler et al., 2007). Os aminoácidos não-protéicos estão presentes nos vegetais de forma livre e exercem papel de proteção contra o ataque de herbívoros devido a sua elevada toxicidade. Eles atuam substituindo os aminoácidos protéicos em suas estruturas, tornando-os inativos (Taiz e Zeiger, 2013).

### **Liberção e modo de ação dos aleloquímicos**

As interações alelopáticas derivam de metabólitos secundários produzidos por plantas e microorganismos. Estes aleloquímicos são produtos naturais bioativos que conduzem à larga ordem

de efeitos biológicos (Macías et al., 2006). Nos vegetais, esses compostos podem ser encontrados nas folhas, caules, raízes, frutos, flores, cascas e sementes (Weir et al., 2004), porém a quantidade e as vias pelas quais são sintetizados diferem de espécie para espécie (Friedman, 1995). No solo, podem combinar-se de várias maneiras e, embora não se conheça todas as funções e substâncias, as que se conhecem podem interferir fortemente no metabolismo de outros organismos (Piña-Rodrigues e Lopes, 2001). A liberação dessas substâncias químicas para o meio pode ocorrer de várias maneiras. Entre as rotas de liberação incluem-se:

#### *Lixiviação*

As toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes ou, ainda, dos resíduos vegetais em decomposição (Almeida, 1988) através da chuva, orvalho e neblina. Pode-se citar, principalmente, a lixiviação dos ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, substâncias pécicas, terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (Souza, 1988; Rodrigues et al., 1992).

#### *Volatilização*

Compostos voláteis são liberados pelas folhas, flores, caules e raízes e podem ser absorvidos por outras plantas. Nesse grupo, encontram-se compostos, como os terpenóides, que atuam sobre as plantas vizinhas por meio dos próprios vapores ou condensadas no orvalho ou, ainda, alcançam o solo e são absorvidos pelas raízes (Souza, 1988; Weidenhamer, 1996).

#### *Exsudação pelas raízes*

Um grande número de compostos alelopáticos são liberados na rizosfera circundante e podem atuar direta ou indiretamente nas interações planta/planta e na ação de microrganismos (Weir et al., 2004). Entre esses compostos, podem ser citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido transcinâmico (Silva, 1978; Silva, 2009).

#### *Decomposição de resíduos*

Toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microrganismos. Perdas da integridade de membranas celulares permitem a liberação de um grande número de compostos que impõem toxicidade aos organismos vizinhos, tais como os glicosídeos cianogênicos (Souza, 1988), ácidos fenólicos, agropireno, cumarinas e flavonóides (Silva, 2009).

O conhecimento dos efeitos alelopáticos e o modo de ação dos aleloquímicos são importantes para o entendimento das interações entre as plantas, tanto nos ecossistemas naturais,

como nos agrícolas (Rodrigues et al., 1993). O modo de ação dos aleloquímicos pode ser dividido em ação direta e indireta. Nesta última podem-se incluir alterações nas propriedades e características nutricionais e, também nas populações de organismos que habitam o solo. O modo de ação direto ocorre quando o aleloquímico liga-se às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo (Ferreira e Áquila, 2000). Alguns autores afirmam que os compostos alelopáticos podem afetar a estrutura e ultra-estrutura celular; concentração e balanço hormonal; permeabilidade das membranas afetando a absorção de minerais; movimento dos estômatos influenciando a fotossíntese; síntese de pigmentos e proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução de seiva, como também podem alterar o DNA e RNA (Gniazdowska e Bogatek, 2005; Singh et al., 2009).

Os aleloquímicos são caracterizados como compostos ativos em multi-sítios, podendo interferir em vários processos fisiológicos de uma planta alvo. A maioria dos efeitos, como redução na germinação e desenvolvimento das raízes, cloroses, diminuição da absorção de íons e anormalidades fisiológicas, morfológicas e anatômicas são causadas por uma variedade de relações específicas entre os aleloquímicos e o sistema celular e/ou molecular (Saldanha, 2013). Portanto, a atividade desses aleloquímicos não pode ser explicada por um único modo de ação (Bais et al., 2003; Reigosa et al., 2004). Outros efeitos adicionais como peroxidação lipídica, mudança na geração de energia e mudanças no conteúdo de água foram observados. Alguns desses sintomas podem estar relacionados à indução de estresse oxidativo secundário. A sobrevivência da planta sob estresse alelopático depende de mecanismos de resistência que levam à desintoxicação, como por exemplo: conjugação, sequestro e oxidação dos aleloquímicos, que pode estar ligado paralelamente com o estresse oxidativo (Saldanha, 2013). Um trabalho realizado por Reigosa et al. (2004) sugere que o processo de desintoxicação pode ser o principal alvo e mais importante sítio de ação dos aleloquímicos.

### **Alelopatia na agricultura**

Dentre os métodos de controle e prevenção de pragas ou doenças agrícolas, o uso de agroquímicos continua sendo o componente mais importante para aumentar o rendimento das colheitas e reduzir o trabalho nas culturas (Silva, 2009). No entanto, o uso continuado de pesticidas em áreas de monocultivo tem levado ao crescente aparecimento, em nível mundial, de biótipos de organismos tolerantes e resistentes a esses produtos sintéticos, o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de produção e problemas graves de contaminação ambiental (Haig et al., 2009; Marangoni et al., 2012; Khaliq et al., 2013; Nebo et al., 2014).

As inúmeras substâncias químicas disponíveis na natureza, produzidas por plantas ou microorganismos, podem oferecer novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de endemias na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente, preservando os recursos naturais e garantindo a oferta de produtos agrícolas com alta qualidade, desprovidos de resíduos de agentes contaminantes (Souza Filho e Alves, 2002). Dentro deste contexto, a alelopatia pode ser empregada no manejo de diversas espécies de plantas daninhas e pragas agrícolas.

### *Herbicidas de origem natural*

Com o desenvolvimento da sociedade humana, promovido pela evolução agrícola e pecuária, as áreas destinadas à atividade rural foram expandidas, ocasionando a ampla distribuição de pragas, patógenos e plantas indesejáveis. Nesse contexto, a comunidade de plantas indesejáveis ou daninhas tornou-se cada vez mais densa e diversificada, com profunda especialização na ocupação dos agroecossistemas (Mortimer, 1990); sendo definida como qualquer planta que ocorre onde não é desejada, ou então uma planta sem valor econômico ou que compete, com o homem, pelo solo (Silva et al., 2007; Concenção et al., 2014). Em termos simples, uma planta pode ser considerada daninha se estiver direta ou indiretamente prejudicando determinada atividade humana (Concenção et al., 2014). Essas pragas co-evoluíram de plantas cultivadas, no entanto elas têm um número de características fisiológicas, agrônômicas e reprodutivas, que as tornam dominantes em comparação as outras plantas. Nos agroecossistemas, elas competem com os recursos das espécies vegetais, reduzem os rendimentos e, deterioram a qualidade da cultura, o que resulta em enormes perdas financeiras (Kohli et al., 2004; Tanveer et al., 2012).

No Brasil, algumas espécies daninhas são documentadas como sendo resistentes aos herbicidas, são elas: leiteira ou amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), picão-preto (*Bidens pilosa* L. e *Bidens subalternans* L.), papuã (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc.), sagitária (*Sagittaria montevidensis* Cham & Schltld.), capim-arroz (*Echinochloa* spp.), junquinho (*Cyperus difformis* L.), milha (*Digitaria* spp.) e cuminho (*Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl) (Baratelli, 2006). Dessas, as espécies mais preocupantes são *E. heterophylla* e *Bidens* spp. pela abundância das infestações, com extraordinária capacidade de multiplicação e crescimento rápido, e impacto econômico na agricultura nacional. Ambas as espécies estão presentes em aproximadamente 75% das áreas de cultivo de soja na região do Planalto e do Estado do Rio Grande do Sul (Vidal e Winkler, 2002).

Souza Filho e Alves (2002) consideram a alelopatia uma alternativa viável no manejo dessas plantas daninhas, devido a seu excelente potencial de interação e importância ecológica, assim como a possibilidade de fornecer novas estruturas químicas para produção de bioativos que combatam as pragas e sejam menos danosos ao ambiente. Recentes estudos estão sendo realizados

na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais por meio de manejos alternativos de plantas daninhas, rotação de culturas, sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, adubação verde, além de sistemas agroecológicos (Kato-Noguchi, 2003; Weston e Mathesius, 2013; Nebo et al.; 2014).

Das centenas de aleloquímicos já identificados, somente alguns têm seus modos de ação identificados. Muitas destas substâncias operam por mecanismos diferentes daqueles dos herbicidas sintéticos, tornando os produtos naturais uma fonte promissora para novos modelos de herbicidas (Vyvyan, 2002). Em resumo, alguns destes mecanismos envolvem a síntese de aminoácidos (glutamina sintetase, aspartato aminotransferase, ornitina carbamiltransferase,  $\beta$ -cistationase), a síntese de pigmentos (ALA sintetase), as funções da membrana plasmática ( $H^+$  - ATPase, NADH oxidase), a fotossíntese (CF1 ATPase), a síntese de lipídeos (AcetilCoA transacilase, 3-oxoacil-ACP sintase, ceramida sintase) e a síntese de ácidos nucléicos (RNA polimerase, adenilsuccinatosintase, AMP desaminase) (Baratelli, 2006).

A sorgoleona e sua forma hidroquinona são aleloquímicos exsudados a partir das raízes de sorgo. Este composto foi o primeiro produto natural isolado com atividade estimulante da germinação (Baratelli, 2006). A atividade fitotóxica da sorgoleona e de seus análogos, pela sua similaridade com a plastoquinona, se dá pela inibição da evolução do  $O_2$  ao longo da cadeia fotossintética. Alguns autores sugerem que a sorgoleona e a atrazina competem pelos mesmos sítios de ligação, e que, além disso, a sorgoleona atue inibindo as reações de transporte de elétrons entre  $Q_A$  e  $Q_B$  na porção redutora do fotossistema II, mais especificamente na proteína  $D_1$  (Baratelli, 2006). Entre os monoterpenos com atividade fitotóxica pode-se citar  $\alpha$  e  $\beta$  pineno e 1,8-cineol produzidos pelos gêneros *Salvia*, *Amaranthus*, *Eucalyptus*, *Artemisia* e *Pinus* (Baratelli, 2006). O ascaridol é o componente majoritário do óleo de *Chenopodium ambrosioides* L., sendo um potente aleloquímico contra o crescimento de *Amaranthus hypocondriacus* L. (Jimenez-Osorio et al., 1996). Várias outras pesquisas também apontam o efeito alelopático inibitório das lactonas sesquiterpênicas sobre o desenvolvimento das plantas daninhas (Macías et al., 2000; Goto et al., 2001; Belz et al., 2007).

A inibição da emergência das espécies, muitas vezes se dá pela interação de vários aleloquímicos, e não somente pela presença de uma única substância. No solo, os efeitos aditivos ou sinérgicos dos aleloquímicos podem ter influência significativa mesmo em baixas concentrações. Quando uma única substância é responsável pelo potencial alelopático de uma planta, e é isolada e identificada, pode ser útil como modelo para o desenvolvimento de novos bioherbicidas (Inderjit e Dakshini, 1995; Xuan et al., 2005). Em muitos casos, o composto natural é altamente ativo para um alvo molecular, mas suas propriedades físico-químicas e sua curta meia-vida no ambiente o impedem de ser um herbicida eficaz. Por exemplo, a sorgoleona, produzida a partir de *Sorghum*

spp., é mais ativa *in vitro* do que a atrazina na inibição do PS II, no entanto, na prática é um herbicida relativamente fraco (Duke et al., 2000).

A complexidade química de muitos metabólitos secundários, que frequentemente apresentam vários centros quirais, é um entrave econômico para a produção em larga escala destes compostos. Em muitos casos, a atividade desejada é frequentemente perdida ou muito reduzida quando a molécula é simplificada (Baratelli, 2006). Apesar disso, alguns compostos extraídos de vegetais superiores, tais como o cineol, as benzoxazinonas, ácido quinolínico e as leptospermonas (Xuan et al., 2005), vêm sendo utilizados na agricultura com resultados promissores.

### *Inseticidas de origem natural*

A utilização de plantas como inseticida é uma prática que vem sendo adotada pelo homem desde a idade antiga (Vendramim, 1997; Penteado, 1999; Viegas Júnior, 2003). Os produtos à base de plantas, além de terem efeito inseticida comprovado, apresentam uma diversidade de compostos ativos, os quais agem sinergicamente, apresentando características atraentes, desalojantes ou repelentes, entre outras que podem ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas dirigidas para controle e monitoramento das populações de insetos (Navarro-Silva et al., 2009).

Nas últimas décadas tem ocorrido um incremento no número de estudos voltados para a interação química inseto-planta, utilizando aleloquímicos vegetais para o controle de pragas (Fazolin et al., 2002). Tradicionalmente, esse controle é feito com aplicações sucessivas de inseticidas sintéticos, mas o uso contínuo desses produtos é indesejável por vários motivos, entre os quais podem ser citados: o desenvolvimento de resistência do inseto a estes produtos; aparecimento de novas pragas ou ressurgência das existentes; desequilíbrios biológicos; efeitos prejudiciais ao homem e inimigos naturais, peixes e outros animais; além dos altos custos que envolvem a sua utilização (Kogan, 1998; Fazolin et al., 2002).

As plantas são ricas em substâncias que podem ser utilizadas no desenvolvimento de métodos seguros aplicados no controle de pragas. Os extratos vegetais com atividade inseticida podem causar diversos efeitos sobre os insetos como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases dos insetos (Muthukrishnan e Pushpalatha, 2001; Sadek, 2003; Knaak e Fiuza, 2010). Segundo Vendramim (1997), as pesquisas com plantas inseticidas são feitas normalmente com dois objetivos: a descoberta de novas moléculas que permitam a formulação de produtos sintéticos ou a obtenção de inseticidas botânicos naturais para uso direto no controle de pragas. Dentre os inseticidas botânicos encontrados no mercado internacional estão àqueles derivados da rotenona, piretrina e azadiractina, e nos mercados locais,

produtos de nicotina e rianodina (Isman, 1997). Outros produtos a base de eucalipto e citronela também são encontrados e comercializados para controle de insetos (Xavier, 2009).

O inseticida botânico rotenona é um composto natural presente na planta *Lonchocarpus* spp. e *Derris* spp. (Leguminosae) encontradas na América do Sul e Ásia, respectivamente (Isman, 2006). Além dessas plantas, a rotenona também pode ser encontrada em diversas outras leguminosas tropicais. Os compostos resultantes da extração da raiz da planta são conhecidos como rotenóides. Estes causam efeitos tóxicos inicialmente nos músculos e nervos, cessando rapidamente a alimentação dos insetos e causam a morte desses algumas horas ou dias após a exposição. Seu modo de ação é caracterizado pela sua potente inibição da respiração celular bloqueando a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (Klaassen e Watkins, 2003; Oikada et al., 2003). A rotenona é considerada um inseticida e acaricida de largo espectro de ação, sendo usada contra lagartas, besouros, pulgas, pulgões, formigas, cigarrinhas, moscas, cochonilhas e ácaros (Xavier, 2009).

O óleo de nim, extraído das sementes da árvore *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), apresenta diversos compostos com atividade biológica, sendo o principal a azadiractina (Niir Board, 2004; Esparza-Díaz et al., 2010; Brasil, 2013). Essa substância causa diversos efeitos nos insetos, como ação deterrente, antiovopositora, redução da aptidão física do inseto, regulação na alimentação, no crescimento e na fecundidade (Mordue e Blackwell, 1993; Brasil, 2013). Devido à alta atividade biológica da azadiractina, *A. indica* é considerada atualmente a mais importante planta inseticida em todo mundo e a sua atividade inseticida já foi referida para mais de 400 espécies de insetos, das quais mais de 100 ocorrem no Brasil (Penteado, 1999; Xavier, 2009). O extrato das sementes de nim, na forma do produto comercial Natuneem e outros produtos são utilizados no controle de moscas-brancas, tripses, cochonilhas, lagartas e besouros (Martinez e Emden, 2001).

O óleo essencial de eucalipto tem o eucaliptol como seu principal constituinte, sendo a concentração dessa substância bastante variável entre as espécies de eucalipto (Chagas et al., 2002). Diversas propriedades terapêuticas já foram atribuídas ao gênero *Eucalyptus*, dentre estas, a atividade larvicida sobre culicídeos (Nathan, 2006; Cheng et al., 2008), inseticida sobre coleópteros (Brito et al., 2006), além da ação repelente sobre *Phlebotomus papatasi* (Yaghoobi-Ershadi et al., 2006). No Brasil, as principais espécies de eucaliptos que tem seus óleos essenciais comercializados são: *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F.M. Bailey, *Eucalyptus citriodora* Hook. e *Eucalyptus globulus* Labill. (Vitti e Brito, 2003).

A citronela é um óleo extraído de plantas do gênero *Cymbopogon* spp. (Poaceae). Estas plantas aromáticas ficaram bem conhecidas por fornecer matéria-prima (óleo essencial) para fabricação de repelentes contra insetos. O óleo de citronela é rico em citronellal, geraniol e limoneno (Raja et al., 2001; Agnolin et al., 2010) e, as plantas que se destacam é o “capim

citronela” (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) (Saito, 2004). O efeito repelente e inseticida de *C. winterianus* tem sido relatado no Brasil também para a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Labinas e Crocomo, 2002).

No entanto, novas substâncias são necessárias para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos (Viegas Júnior, 2003). A busca de novos produtos naturais com atividade inseticida é um caminho promissor, já que as fitotoxinas oferecem uma ampla gama de novos sítios de ação nos organismos alvo e, estes constituem uma alternativa ao desenvolvimento de bioinseticidas (Knaak e Fiuza, 2010).

### **Alelopatia no Cerrado**

O Cerrado é um domínio fitogeográfico que inclui o cerrado *sensu lato* (complexo de biomas formado por: campo topical, savanas ou cerrado *strictu sensu* e floresta estacional), floresta ripícola, campo ripícola, floresta estacional semidecídua, floresta estacional decídua, campo úmido, entre outros (Batalha, 2011). Campos tropicais são formações tropicais em que o estrato herbáceo é contínuo, com pequenos arbustos em baixas densidades (Woodward, 2008). Segundo a classificação fisionômica de Coutinho (1978), no bioma de campo tropical pode ser incluído o campo limpo. Já as savanas são formações tropicais em que o estrato herbáceo é quase contínuo, interrompido apenas por arbustos e árvores em densidades variáveis, e em que os principais padrões de crescimento estão associados às estações úmidas e secas alternantes (Bourlière e Hadley, 1983). No bioma de savana, portanto, pode ser incluído o campo sujo, o campo cerrado e o cerrado *sensu stricto*. Florestas estacionais são formações em que predominam árvores de maior porte, cujas copas formam um dossel e cujos principais padrões de crescimento também estão associados às estações úmidas e secas alternantes (Woodward, 2008), neste bioma de floresta estacional está incluído o cerradão (Batalha, 2011).

Assim, de acordo com Batalha (2011), podemos usar a palavra “cerrado” em três sentidos: 1) Cerrado, com a inicial maiúscula, quando estivermos nos referindo ao domínio fitogeográfico do Cerrado, incluindo não só o cerrado *sensu lato*, mas também os outros tipos vegetacionais que ali se encontram; 2) cerrado *sensu lato* ou simplesmente cerrado, quando estivermos nos referindo ao cerrado enquanto tipo vegetacional, isto é, do campo limpo ao cerradão – aqui há um complexo de biomas, bioma dos campos tropicais, das savanas e das florestas estacionais; e 3) cerrado *sensu stricto*, quando estivermos nos referindo a uma das fisionomias savânicas do cerrado *sensu lato*. É importante usarmos tais termos de forma precisa e acurada para definir aquilo que se pretende

estudar e conservar nesse complexo de biomas, toda a biodiversidade que compõe o cerrado (Batalha, 2011).

Segundo Sano et al. (2008), estes são os biomas mais fragmentados do Brasil. Sua área total original era de 204,7 milhões de hectares (IBGE, 2004), a segunda maior do país, perdendo apenas para os biomas da Amazônia (Klink e Machado 2005; Forzza et al., 2010; Novaes et al., 2013a). O domínio Cerrado se desenvolveu em solos antigos, profundos, hidratados por aquíferos, ácidos e pobres em nutrientes, mas com elevado conteúdo de alumínio (Haridasan, 2001). Apesar do Cerrado ser um *hotspot* mundial (Myers et al., 2000), com 44% das espécies vegetais endêmicas, é a savana tropical mais rica do mundo (Klink e Machado, 2005). Atualmente, as principais pressões da agricultura sobre o Cerrado são a pecuária e as monoculturas de soja, sendo responsáveis por desmatamentos ainda maiores que os observados na Amazônia (Klink e Machado 2005).

Além das consequências da fragmentação, embora o Cerrado ser adaptado ao fogo, os regimes de queima de pastagens e da cana-de-acúcar na época seca resultaram em grandes problemas com a lixiviação, compactação e erosão do solo. O fogo facilita a invasão de espécies exóticas altamente competitivas, principalmente de gramíneas africanas, as quais produzem grande quantidade de biomassa, que quando seca no inverno, favorece novos incêndios (Klink e Machado 2005, Carmo et al. 2011). Essas características agravam as interações ecológicas entre as espécies vegetais e destas com os fatores abióticos, tornando este domínio fitogeográfico uma importante fonte de estudo do ponto de vista alelopático (Oliveira et al., 2004; Grisi et al., 2013).

Pesquisas com espécies oriundas do Cerrado têm mostrado que extratos de diferentes partes vegetais apresentam ação fitotóxica no desenvolvimento e no crescimento de plantas alvo (Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2014). Em estudos realizados com extratos aquosos das folhas de *Drimys brasiliensis* Miers foi possível observar inibição tanto na germinação como no crescimento das plântulas de gergelim (Anese et al., 2014). Imatomi et al. (2013) constataram efeitos fitotóxicos de algumas espécies da família Myrtaceae sobre a germinação e desenvolvimento inicial de alface, cebola e tomate. Em *Aristolochia esperanzae* Kuntze (papo-de-peru) foi observado que extratos aquosos de diversas partes desta planta causaram alterações na germinação e no crescimento das plântulas de gergelim (Gatti et al., 2010). Tais resultados mostram o potencial das espécies do Cerrado como fontes de substâncias químicas, abrindo frentes de estudo para os efeitos alelopáticos tanto em nível de relações ecofisiológicas como em sistemas agrícolas.

## **Família Sapindaceae**

A família Sapindaceae está incluída na ordem Sapindales (Eudicotiledôneas), juntamente com mais oito famílias: Anacardiaceae, Biebersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Nitrariaceae

(incluindo Peganaceae e Tetradielidaceae), Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae (APG III, 2009, Judd et al., 2009), possui 471 gêneros e 6070 espécies (Stevens, 2011), sendo uma das maiores ordens de angiospermas em termos de números de gêneros e espécies (Gadek et al., 1996). A família Sapindaceae compreende ca. 1756 espécies e 136 gêneros. No Brasil está representada por 25 gêneros e ca. 411 espécies, sendo 187 endêmicas (Joly, 2005; Forzza et al., 2010). Possui uma distribuição predominantemente pantropical com ocorrência de alguns táxons em áreas temperadas (Buerki et al., 2009), podendo ser encontrada em diversos ambientes e tipos vegetacionais. Seu maior gênero é *Serjania* Mill. (220 spp.) seguido de *Paullinia* L. (150 spp.), *Acer* (110 spp.) e *Allophylus* (100 spp.) (Joly, 2005; Judd et al., 2009).

A família Sapindaceae é constituída por representantes que se apresentam com diferentes formas de vida, englobando desde as trepadeiras, como em *Serjania* e *Paullinia*, até árvores de grande porte, como em *Talisia* Aubl. e *Cupania* L. (Guarim Neto, 2000; Judd et al., 2009). O potencial econômico das espécies dessa família é altamente significativo. Em um trabalho etnobotânico, Guarim-Neto et al. (2000), catalogaram 52 espécies distribuídas em 17 gêneros, compilando dados da sua utilização e evidenciando a importância econômica para as populações humanas. Entre os representantes podem ser citados o guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), a lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), a pitomba (*Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk.), e o rambotão (*Nephelium lappaceum* L.) com frutos comestíveis (Souza e Lorenzi, 2005, Buerki et al., 2009); enquanto, o fruto de *Sapindus saponaria* L. (sabão-de-soldado) pode ser usado como sabão natural devido à presença de saponinas (Souza e Lorenzi, 2005, Judd et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que essa família é uma fonte rica de fitoquímicos, como isoprenóides e polifenóis (Hegnauer, 1973), saponinas (Voutqenne et al., 2002), triterpenos (Chávez e Delgado, 1994), diterpenos (Ortega et al., 2001), flavonóides (Mahmoud et al., 2001), lectinas (Freire et al., 2002) e hidrogéis (Gorin et al., 1996). Esses compostos proporcionam várias propriedades e atividades farmacológicas, das quais se destacam: estimulantes, antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-diabéticos (Sofidiya et al., 2008; Simpson et al., 2010; Veeramani et al., 2010; Muthukumran et al., 2011).

### ***Sapindus saponaria* L.**

*Sapindus saponaria* (Figura 1), pertencente à família Sapindaceae, conhecida popularmente por saboneteiro, sabão-de-macaco, jequitinhaçu, fruta-de-sabão e sabão-de-soldado, é uma árvore nativa, pioneira, perenifólia ou semidecídua, heliófita, de médio porte (até 8m), utilizada em paisagismo e em modelos de recuperação de áreas degradadas, em margens de rios (Albiero, 2001). No Brasil, ocorre desde o Pará até o Rio Grande do Sul, com distribuição regular nos estados das

regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste. Encontra-se habitualmente em locais úmidos, nas florestas pluvial e semidecídua. Apresenta copa densa e perfeitamente globosa. As folhas são compostas imparipenadas com sete folíolos glabros de 10- 16cm de comprimento por 3-4 cm de largura. Suas flores são brancas, dispostas em panículas. Os frutos são multiglobosos (Figura 1), amarelados quando maduros e com sementes globulosas não ariladas, pretas e duras. A dispersão é barocórica e zoocórica por morcegos frugívoros (Lorenzi, 2002).

A espécie é conhecida não apenas pela utilização da madeira, mas também pela presença de saponinas, um surfactante natural encontrado nas sementes e nos frutos. A madeira é moderadamente pesada, dura, compacta, de baixa durabilidade natural, sendo empregada na construção civil. Os seus frutos são utilizados pela população como sabão, no banho e no combate a úlceras, feridas na pele e inflamações (Albiero et al., 2001; Pelegrini, et al., 2008). As sementes, por conterem óleo, têm sido utilizadas como inseticidas (Guarim Neto et al., 2000; Porras e Lopez-Avila, 2009). Além das saponinas, os principais compostos encontrados no gênero *Sapindus* são flavonóides, triterpenos, esteróides e glicosídeos (Pelegrini et al., 2008). O estudo realizado por Murgu e Rodrigues-Filho (2006) levou ao isolamento de duas principais classes de substâncias presentes nos frutos de *S. saponaria*: saponinas e oligoglicosídeos de sesquiterpenos acíclicos (OGSA) (Figura 2), ambas em quantidade bastante elevada.



Figura 1. *Sapindus saponaria* e seus respectivos frutos (Grisi, 2010).

As saponinas compreendem um vasto grupo de glicosídeos, amplamente distribuído em todo reino vegetal. Geralmente, são solúveis em água e formam espuma devido à presença de grupos funcionais lipofílicos e açúcares. Com base em suas agliconas, as saponinas podem ser classificadas

em dois grupos: esteroidais ou triterpênicos (Santos, 2006). Saponinas esteroidais são normalmente encontradas em monocotiledôneas, principalmente nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae e Agavaceae, já as triterpênicas ocorrem em eudicotiledôneas, nas famílias Sapindaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Cariofiyllaceae e outras (Sparg et al., 2004). As saponinas, em geral, apresentam massa molecular elevada, de 600 a 2000 g mol<sup>-1</sup>, e normalmente ocorrem em misturas complexas devido à presença concomitante de estruturas com número variado de açúcares e grupos acetatos ou ainda devido à presença de diversas agliconas (Simões et al., 2003; Santos, 2006).

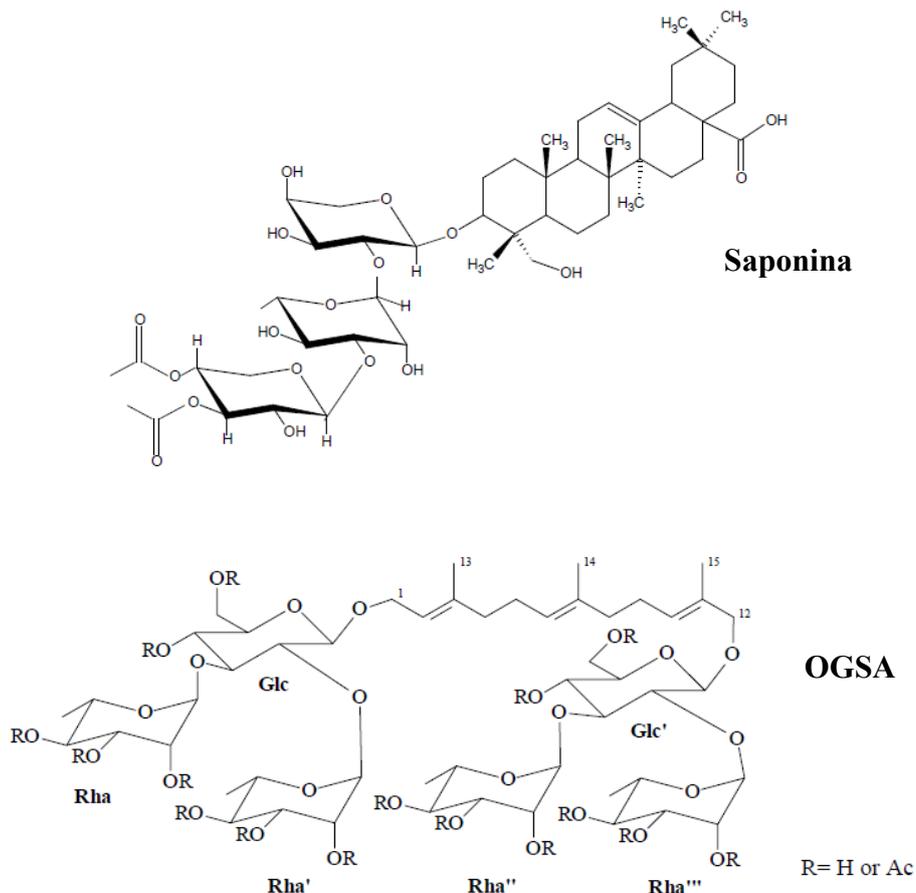


Figura 2. Estrutura da saponina e do OGSA isolados dos frutos de *Sapindus saponaria* (Murgu e Rodrigues Filho, 2006).

Saponinas são amplamente utilizadas na medicina, alimentação e higiene. A principal atividade dessas substâncias é a ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando a destruição das células (Santos, 2006). Essas substâncias possuem atividades biológicas diversas como ação moluscicida, piscicida, anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica (Sparg et al., 2004; Tsuzuki et al., 2007) e propriedades reguladoras do crescimento de plantas (Ohara e Ohira, 2003). As saponinas esteroidais são ainda

essenciais na fabricação de contraceptivos orais e outros hormônios (Marston e Hostettmann, 1995). Uma das teorias mais aceita para explicar a alta concentração de saponinas em muitas espécies de plantas é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, sejam estes fungos, bactérias ou vírus (Sparg et al., 2004).

Os oligoglicosídeos sesquiterpênicos acíclicos (OGSA) (Figura 2), como o próprio nome sugere, são glicosídeos formados por uma ou mais cadeia(s) de açúcar(es) e uma unidade sesquiterpênica. Essa classe de compostos possui como característica massa molecular elevada, normalmente acima de  $1000 \text{ g mol}^{-1}$  (Santos, 2006). Poucas atividades biológicas são atribuídas a esses compostos, no entanto atuam como surfactantes naturais e agentes expectorante, principalmente em culturas orientais (Wong et al., 1991 e Sun et al., 2002).

Apesar das plantas de *S. saponaria* se destacarem por ser uma boa fonte de saponinas bioativas, há uma falta de estudos detalhados sobre sua composição química e suas atividades biológicas (Tsuzuki et al., 2007; Pelegrini et al., 2008), uma vez que estas têm sido concentradas, especificamente, em propriedades farmacológicas.

### ***Serjania lethalis* A. St.-Hil.**

*Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae), comumente chamada de cipó-timbó ou mata-fome (Figura 3), é uma liana de caule triangular, ramos cilíndricos ou pouco triangulares; corpos lenhosos compostos, com folhas biternadas, medindo até 27 cm de comprimento e pecioladas; seus folíolos são lanceolado-elípticos, quase sésseis, obtusos, também acuminados, de base e ápice estreitos, íntegros ou com um a três dentes, os quais são glabros e coriáceos. As inflorescências se apresentam em tirsos solitários ou reunidos em pequenas panículas apicais. Suas flores são alvas e pequenas. O cálice possui sépalas lanuginosas. Os frutos são cordado-triangulares, medindo até 3 cm de comprimento e as sementes são subglobosas (Guarim-Neto e Santana, 2000). A espécie *S. lethalis* é uma planta nativa no Brasil e encontrada em todas as regiões: Norte (AP, AM, AC), Nordeste (PI, CE, PE, BA), Centro-Oeste (MT, GO, DF, MS), Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (PR, SC), sendo assim associada aos vários biomas, como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Guarim Neto e Santana 2000; Forzza et al., 2010).

O cipó-timbó é tradicionalmente utilizado contra inflamações, doenças infecciosas e cutâneas, tais como úlcera, diarreia, febre e malária (Cruz, 1979; Napolitano et al., 2005). A espécie é também conhecida pela sua ação piscicida (Balbach, 1963), larvicida (Rodrigues et al., 2006), anti-bacteriana (Lima et al., 2006) e antiinflamatória (Napolitano et al., 2005). Além disso, estudos recentes constataram que os extratos aquosos e etanólicos de folhas de *S. lethalis* podem apresentar substâncias com propriedades fitotóxicas, por inibirem o desenvolvimento de algumas espécies alvo

(Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2015). Dessa maneira, embora se conheça a composição fitoquímica de *S. lethalis* e, seus efeitos como propriedades farmacológicas, poucos trabalhos examinaram o potencial fitotóxico da espécie.



Figura 3. *Serjania lethalis* encontrada na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” da Universidade Federal de São Carlos (Pereira, 2014) e suas respectivas folhas.

## Objetivos

Tendo em vista a importância que representa o uso de extratos botânicos dentro do manejo integrado de pragas e o interesse de se conhecer as diferentes atividades biológicas das espécies da família Sapindaceae, o objetivo do trabalho consistiu em ampliar o conhecimento sobre fitotoxicidade de *S. saponaria* e *S. lethalis*. Para isso levantaram-se as seguintes questões:

(1) Os extratos de folhas e caules/cascas do caule de *S. lethalis* e *S. saponaria* poderiam interferir no processo de germinação dos diásporos e crescimento das plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.)?

(2) Além disso, esses extratos poderiam afetar o desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), possibilitando, assim, a busca por um composto que controle estas espécies daninhas?

(3) Os extratos fracionados de *S. saponaria* poderiam apresentar atividade inseticida sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae)?

(4) Dentre os extratos ativos, qual o mais promissor para se iniciar uma bioprospecção, permitindo isolar e identificar os compostos presentes?

## Referências

ABDELGALEIL, S.A.M., ABDEL-RAZEEK, N., SOLIMAN, S.A. Herbicidal Activity of Three Sesquiterpene Lactones on Wild Oat (*Avena fatua*) and Their Possible Mode of Action. **Weed Science**, v. 57, p. 6-9, 2009.

AERTS, R.J.; SNOEIJER, W.; MEIJDEN, E.V.D.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2947-2951, 1991.

AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; LEAL, M.L.R.; BECK, R.C.R.; MEINERZ, G.R.; PARRA, C.L.C.; MACHADO, P.R.; FOLETTO, V.; BEM, C.M.; NICOLODI, P.R.S.J. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 482-487, 2010.

ALBIERO, A.L.M.; BACCHI, E.M.; MOURÃO, K.S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.

ALMEIDA, F.S. **Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 68 p.

ANESE, S.; GRISI, P.U.; JATOBA, L.J.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V.C.; GUALTIERI, S.C.J. Seasonal variation in phytotoxicity of *Drimys brasiliensis* Miers. **Idesia**, v. 32, n. 3, p. 109-116, 2014.

APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP) III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Allelopathy and exotic plants: from genes to invasion. **Science**, v. 301, p. 1377-1380, 2003.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica II**. A Verdade Presente, São Paulo. 23 ed 1963a.

BARATELLI, T.G. **Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)**. 2006. 185f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BARZ, W.; HORSEL, W. Metabolism of flavonoids. In: HARBORNE, J.B. ed. **The flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1975. p. 916-969.

BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 2011.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KAUR, S. Crop allelopathy and its role in ecological agriculture. **Journal of Crop Production**, v. 4, n. 2, p. 121-161, 2001.

BELZ, R.G.; REINHARDT, C.F.; FOXCROFT, L.C.; HURLE, K. Residue allelopathy in *Parthenium hysterophorus* L. – Does parthenin play a leading role? **Crop Protection**, v. 26, p. 237-245, 2007.

BLUM, M.S. The importance of alkaloidal functions. Pp. 163- 182. In: MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., MOLINILLO, J.M.G., CUTLER, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press, 2004.

BOURLIÈRE, F.; HADLEY, M. Present-day savannas: an overview. In: **Ecosystems of the world – tropical savannas** (D.W. Goodall, ed.). Elsevier, Amsterdam, p. 1-17, 1983.

BRASIL, R.B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM). **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17; p. 3252-3268, 2013

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; BORTOLI, S.A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 96-103, 2006.

BUERKI, S.; FOREST, F.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; CALLMANDER, M.W.; NYLANDER, J.A.A.; HARRINGTON, M.; SANMARTÍN, I.; KÜPFER, P.; ALVAREZ, N. Plastid and nuclear markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 2, p. 238-258, 2009.

CARMO, A.B.; VASCONCELOS, H.L.; ARAUJO, G.M. Estrutura da comunidade de plantas lenhosas em fragmentos de cerrado: relação com o tamanho do fragmento e seu nível de perturbação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, p. 31-38, 2011.

CASTRO, A.H.F., ALVARENGA, A.A., SOARES, A.M., YOUNG, M.C.M., PURCINO, A.A.C. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 7, p. 45-55, 2005.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J. FORTES, I.C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247-253. 2002.

CHÁVEZ, M.I.; DELGADO, G. Isolation and relay synthesis of 11<sub>h</sub>-hydroperoxy diacetyl hederagenin, a novel triterpenoid derivative from *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic implications. **Tetrahedron**, v. 50, p. 3869-3878, 1994.

CHENG, A., LOU, Y., MAO, Y., LU, S., WANG, L., CHEN, X. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 49, p.179-186, 2007.

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technolog**, v. 100, p. 452-456, 2008.

CHOU, C.H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M.J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 1-9.

CHOWHAN, N.; SINGH, H.P.; BATISH, E.R.; KAUR, S.; AHUJA, N.; KOHLI, R.K.  $\beta$ -Pinene inhibited germination and early growth involves membrane peroxidation. **Protoplasma**, v. 250, p. 691-700, 2013.

CONCENÇO, G.; ANDRES, A.; SILVA, A.F.; GALON, L.; FERREIRA, E.A.; ASPIAZÚ, I. Ciências das plantas daninhas: histórico, biologia, ecologia e fisiologia. In: MONQUERO, P.A. (Org.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos, SP: RiMa, 2014. p. 83-101.

COUTINHO, L.M. **O conceito de cerrado**. Revista Brasileira de Botânica, v. 1, n. 1, p. 17-23, 1978.

CRUZ, G. L., **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, Editora Civilização Brasileira RJ, n. 2094, 1979.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4022–4034, 2009.

DELFINE, S.; CSIKY, O.; SEUFERT, G.; LORETO, F. Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoidemitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition translocation, and effect of the photosynthetic properties at high temperatures. **New Phytology**, v. 146, p. 27-36, 2000.

DEWICK, P.M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and steroids. Pp. 167-231. **Medicinal Natural Products**. John Wiley & Sons, Ltd. 2002. University of Nottingham, UK.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, 1893-1902, 2004.

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.

DUKE, S.O.; OLIVA, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.

EINHELLIG, F.A. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G. (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press, 2004.

ESPARZA-DÍAZ, G.; COLLADO, J.L.; VILLANUEVA-JIMÉNEZ, J.A.; OSORIO-ACOSTA, F.; OTERO-COLINA, G.; CAMACHO-DÍAZ, E. Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. JUSS. **Agrociencia**, v. 44, n. 7, p. 821-833, 2010

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43-52, 2001.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; LIMA, A.P.; ARGOLLO, V.M. Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyne). Embrapa Acre. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 37, 42 p., 2002.

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

FERREIRA, M.M.M., OLIVEIRA, A.H.C., SANTOS, N.S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 2, p. 57-60, 2008.

FORZZA, R.C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 21-42.

FREIRE, M.G.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; DE SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. Pp. 629-644. In: J. kegel & G. Galili (eds.). **Seed development and germination**. Marcel Dekker Inc., New York. 1995.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 685-687.

GADEK, P.A.; Fernando, E.S.; Quinn, C.J.; Hoot, S.B.; Terrazas, T.; Sheahan, M.C.; Chase, M.W. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 6, p. 802-811, 1996.

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

GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Terpenoids. In: ROSENTHAL, G.A; BERENBAUM, M.R. eds. **Herbivores their interactions with secondary metabolites**. New York: Academic Press, 1991. p. 165-219.

GERSHENZON, J. The cost of plant chemical defenses against herbivory: a biochemical perspective. In: BERNAYS, E.A. ed. **Plant - insect interactions**. Florida: CRC Press Boca Roton, 1993. v. 5, p. 105-173.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 27, p. 395-407, 2005.

GODARD, K.A.; WHITE, R.; BOHLMANN, J. Monoterpene induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1838-1849, 2008.

GOLDBERG, D.E.; BARTON, A.M. Patterns and consequences of interspecific competition in natural communities: a review of field experiments with plants. **The American Naturalist**, v. 139, n. 4, p. 771-801.

GORIN, A.J.P.; TEIXEIRA, A.Z.A.; TRAVASSOS, R.L.; LABORIAN, S.L.M., LACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magnosia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, v. 286, p. 325-333, 1996.

GOTO, Y.; KOJIMA, Y.; NAKAYAMA, T.; TERAZAWA, M. Allelopathic sesquiterpenoids from rhizomes of *Petasites japonicus* ssp. *giganteus* Kitam. **Phytochemistry**, v. 57, p. 109-113, 2001.

GOTTLIEB, O.R. **Micromolecular, evolution, systematics and ecology**: an essay into a novel botanical discipline, Berlin: Springer-Verlag, 1982, 170p.

GRAÑA, E.; SOTELO, T.; DÍAZ-TIELAS, C.; ARANITI, F.; KRASUSKA, U.; BOGATEK, R.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. **Journal Chemical Ecology**, v. 39, p. 271-282, 2013a.

GRAÑA, E.; SOTELO, T.; DÍAZ-TIELAS, C.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. The Phytotoxic Potential of the Terpenoid Citral on Seedlings and Adult Plants. **Weed Science**, v. 61, p. 469-481, 2013b.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C.; FORIM, M.R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, v. 31, p. 239-248, 2013.

GUARIM-NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. Notas Etnobotânicas de Espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botânica Brasilica**, v. 14. p. 327 – 334. 2000.

HAIG, T.J., HAIG, T.J., SEAL, A.N., PRATLEY, J.E., AN, M., WU, H. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 1129-1136, 2009.

HARIDASAN, M. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. Pp. 68-83. In: McClain, M.E., Victoria, R.L; Richey, J.E. (ed). **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. New York, Oxford University Press, 2001.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen IV**. Birkhauser Verlag, Basel, 1973.

HIERRO, J.L.; CALLAWAY, R.M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, p. 29-39, 2003.

HINOJOSA, G.F. Auxina em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: CID, L.P.B. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 15-57.

IBGE. **Mapa de biomas do Brasil**. Rio de Janeiro, 2004. IBGE. <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S.C.J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 1, p. 54-61, 2013.

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

INDERJIT; DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2014. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Agosto de 2014).

- ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, v. 25, n. 4, p. 339-344. 1997.
- ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66. 2006.
- JIMENEZ-OSORIO, F.M.V.Z.J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 1996.
- JOLY, A. B. **BOTÂNICA: introdução à taxonomia vegetal**. 13ª edição. São paulo: Companhia Editora Nacional, v. 4, p. 420-428. 2005.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. ed. 3. Porto Alegre: Artmed, 429-440p, 2009.
- KHALIQ, A., MATLOOB, A., KHAN, M.B., TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.
- KLAASSEN, C.D.; Watkins, J.B. **Essentials of toxicology**. New York: McGraw Hill. 2003. 533 p.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707-713, 2005.
- KNAAK, N; FIÚZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.
- KOGAN, M. Integrated pest management historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 243-270. 1998.
- KOHLI, R.K., BATISH, D.R., SINGH, H.P. Weeds and Their Management – Rationale and Approaches. In Singh HP, Batish DR, Kohli RK (eds) **Handbook of Sustainable Weed Management**, In Press. Haworth Press, Inc., USA, 2004.
- LABINAS, M.A.; CROCOMO, W.B. Effect of java grass (*Cymbopogon winteranus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.
- LARCHER, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos. Rima Editora.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 368p. 2002.
- LORTIE, C.J.; BROOKER, R.W.; CHOLER, P.; KIKVIDZE, Z.; MICHALET, R.; PUGNAIRE, F.I.; CALLAWAY, R.M. Rethinking plant community theory. **Oikos**, v. 107, p. 433-438, 2004.
- MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.; GALINDO, J.C.G.; Dehydrozaluzein C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. **Phytochemistry**, v. 54, p. 165-171, 2000.

MACÍAS, F.A.; FERNANDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; ALVES, P.L.C.A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795-800, 2006.

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

MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Saponins. Chemistry & Pharmacology of Natural Products**. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

MARTINEZ, S.S.; EMDEN, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 113-125, 2001.

MICHALET, R.; BROOKER, R.W.; CAVIERES, L.A.; KIKVIDZE, Z.; LORTIE, C.J.; PUGNAIRE, F.I.; VALIENTE-BANUET, A.; CALLAWAY, R.M. Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? **Ecology Letters**, v. 9, p. 767-773, 2006.

MAHMOUD, I.; MOHARRAN, F.A.; MARZOUK, M.S.; SOLIMAN, H.S.; EL-DIB, R.A. Two new flavonol glycosides from leaves of *Koelreuteria paniculata*. **Die Pharmazie**, v.56, p. 580-582, 2001.

MORDUE, A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: a update. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, p. 903-924. 1993.

MORTIMER A.M. The biology of weeds. In: HANCE, R. J.; HOLLY, K. (eds.) **Weed control handbook: principles**. 8ed. London: Blackwell Scientific Publications. 582p. 1990.

MÜLLER, C.H. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetation composition. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, v. 39, n. 4, p. 322-351, 1966.

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.

MUTHUKUMRAN, P.; BEGUMAND, V.H.; KALAIARASAN, P. Antidiabetic activity of *Dodonaea viscosa* (L) leaf extracts. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 136-139, 2011.

MUTHUKRISHNAN, J.; PUSHPALATHA, E. Effects of plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. **Journal of Applied Entomology**, v. 125, p. 31-35, 2001.

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

NIIR BOARD. 2004. **Handbook on Neem and Allied Products**. National Institute of Industrial Research. New Delhi, India. 478 p.

- NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.
- NATHAN, S.S.; SAVITHA G.; GEORGE, D.K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P. G. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1316-1323, 2006.
- NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE, J.E.L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.1, p.1-6, 2009.
- NEBO, L.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226-232, 2014.
- NOVAES, P.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.
- OHARA, S.; OHIRA, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. **Journal of Wood Sciences**, v. 49, p. 59-64, 2003.
- OIKADA, S.T.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, M.; KAWANISHI, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone induced apoptosis. **Life Science**, v. 73, p. 3277-3288. 2003.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 401-406, 2004.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A.J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva**, v. 7, p. 1-34, 2008.
- ORTEGA, A.; GARCIA, E.P.; CAIDENAS, J.; MANCERA, C.; MARQUINA, S.; GORDUNO, C.I.M.; MALDONADO, E. Methylodonates, a new type of diterpene with modified derodane skeleton from *Dodenaia viscosa*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 2981-2989, 2001.
- PELEGRINI, D.D.; TSUZUKI, J.K.; AMADO, C.A.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.
- PENTEADO, S.R. **Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável**. Campinas: CATI. 1999. 79 p.
- PEREIRA, V.C.; ANESE, S.; GRISI, P.U.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S.C.J.; RODRIGUES FILHO, E. Phytotoxic potential of *Serjania lethalis* leaves on *Sesamum indicum*. **Acta Biologica Colombiana**, v. 20, n. 1, p. 31-37, 2015.

PEREIRA, V.C.; GRISI, P.U.; DODONOV, P.; ANESE, S.; GUALTIERI, S.C.J. Atividade fitotóxica de *Sergania letalhis* sobre a germinação e crescimento de *Panicum maximum*. **Biotemas**, v. 27, p. 29-35, 2014.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.130 - 136, 2001.

POONPAIBOONPIPAT, T.; PANGNAKORN, U.; SUVUNNAMEK, U.; TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 403-407, 2013.

PORRAS, M.F.; LOPEZ-AVILA, A. Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 35, n. 1, p. 7-11, 2009.

PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 431-451, 1978.

RAHMAN, A.; AHAMED, A.; AMAKAWA, T.; GOTO, N.; TSURUMI, S. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. **Plant Physiology**, v. 125, p. 990-1000, 2001.

RAJA, N.; ALBERT, S.; IGNACIMUTHU, S.; DORN, S. Effect of volatile oils in protecting stored *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 2, p. 127-32, 2001.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2010. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

REIGOSA, M.J.; SANCHES-MOREIRAS, A.M.; PEDROL, N.; COBA DE LA PENA, T.; PAZOS, E.; BAERSON, S.; DUKE, S.O. Mode of action of BOA: Multifaceted approach, 2004. In: **Proceeding of Second Allelopathy Symposium "Allelopathy – from under standing to application"** Puławy, Poland: 95.

RENTZSCH, S.; PODZIMSKA, D.; VOEGELE, A.; IMBECK, M.; MÜLLER, K.; LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellin-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of  $\alpha$ -amylases and  $\beta$ -amylases. **Planta**, v. 235, p. 137-151, 2012.

RICE, E.L. **Allelopathy**. USA, Academic press, 1984.

RIZVI, S.J.H.; TAHIR, M.; RIZVI, V.; KOHLI, R.K.; ANSARI, A. Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 773-796, 1999.

RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

- RODRIGUES, L.R.A.; ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D. **Alelopatia em forrageiras e pastagens**. In: Simposio sobre ecossistema de pastagens, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1993.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 18 p. Boletim, 1992.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, p. 43-50, 2001.
- SADEK, M.M. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 396-404, 2003.
- SAITO, M.L. As plantas praguicidas. **Informativo meio ambiente e agricultura**, v. 12, n. 47, p. 1-11, 2004.
- SALDANHA, L.L. **Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess**. 2013. 161f. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu-SP, 2013.
- SANO, E.E.; ROSA, R.R.; BRITO, J.L.S.; FERREIRA, L.G. Mapeamento semi-detalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 153-156.
- SANTOS, L.F.A. **Contribuição ao estudo do metabolismo micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria***. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2006.
- SCOGNAMIGLIO, M.; FIUMANO, V.; ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R.; FIORENTINO, A. Chemical interactions between plants in Mediterranean vegetation: The influence of selected plant extracts on *Aegilops geniculata* metabolome. **Phytochemistry**, v. 106, p. 69-85, 2014.
- SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 318 p.
- SILVA, C.B. **Avaliação do potencial de atividade alelopática da parte aérea e subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae)**. 2009. 142f. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2009.
- SILVA, Z.L. Alelopatia e defesa em plantas. **Boletim Geográfico**, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.
- 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.
- SIMPSON, B.; CLAUDIE, D.; SMITH, N.; WANG, J.P.; MCKINNON, R.; SEMPLE, S. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Dodonaea polyandra*, a Kaanju traditional medicine. **Journal of Apicultural Research**. v. 6, n. 2, p. 95-98. 1967, 2010.

- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Allelopathy in agroecosystems: a overview. **Journal of Crop Production**, v. 4, p. 1-41, 2001.
- SINGH, H.P.; KAUR, S.; MITTAL, S.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibit plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 154-162, 2009.
- SMITH, P.M. 1976. **The chemotaxonomy of plants**. Edward Arnold, Bristol.
- SOFIDIYA, M.O.; JIMOH, F.O.; ALIERO, A.A; AFOLAYAN, A.J.; ODUKOYA, O.A.; FAMILONI, O.B. Antioxidant and antibacterial properties of *Lecaniodiscus cupanioides*. **Research Journal of Microbiology**. v. 3, n. 2, p. 91-98, 2008.
- SOUZA, C.Z.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 640p, 2005.
- SOUZA, I.F. Alelopatia de plantas daninhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 150, p. 75-78, 1988.
- SOUZA FILHO, A.P.S. Alelopatia: princípios básicos e mecanismos de interferências. In: MONQUERO, P.A. (Org.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos, SP: RiMa, 2014. p. 83-101.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. **Alelopatia em ecossistema de pastagem cultivada**. Belém: Embrapa – Cpatu, 1998. 72 p. (Embrapa – Cpatu. Documentos, 109).
- SOUZA, F.M. **Associações entre as espécies arbóreas do dossel e do subosque em uma Floresta Estacional Semidecidual**. 2007. 106 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.
- STEVENS, P.F. Versão 9, junho 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Disponível em <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>. Acessado em 01.3.2011.
- SUN, J.R.; CHENG, K.C.; PAN, T.Y.; SI, X.M. A new acyclic sesquiterpene oligoglycoside from pericarps of *Sapindus mukuross*. **Chinese Chemical Letters**, v. 13, n. 6, p. 555-556, 2002.
- SZCZEPANSKI, A.J. Allelopathy as a mean of biological control of water weeds. **Aquatic Botany**, v. 3, p. 193-197, 1977.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.
- TANVEER, A.; JABBAR, M.K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R.N.; JAVAID, M.M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

- THULER, R.T., DE BORTOLI, S.A.; HOFFMANN-CAMPO C.B. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e à presença de glucosinolatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 467-474, 2007.
- TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, 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 and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.
- VEERAMANI, C.; PUSHPAVALLI, G.; PUGALENDI, K.V. In vivo antioxidant and hypolipidemic effect of *Cardiospermum halicacabum* leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 107-125, 2010.
- VENDRAMIM, J.D. **Uso de plantas inseticidas no controle de pragas**. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2., Campinas, 1997. Campinas: Fundação Cargill, 1997. p.64-69.
- VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.
- VIDAL, A.R.; WINKLER, L.M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 31-42, 2002.
- VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.
- VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de Eucalipto. IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, **Documentos Florestais**, n. 17, p. 2-25, 2003.
- VOUTQUENNE, L.; KOUKOUKAN, C.; LAVAND, C.; POUNY, I.; LITAUDON, M. Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austrocaledonica*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 825-832, 2002.
- VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.
- XAVIER, V.M. **Impacto de inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 43f. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009.
- XUAN, T.D.; SHINKICHI, T.; KHANH, T.D.; MIN, C.I. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, n. 3, p. 197-206, 2005.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- WEIDENHAMER, J.D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 866-875, 1996.
- WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 472-479, 2004.

WESTON, L.A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **Journal Chemical Ecology**, v. 39, p. 283-297, 2013.

WILLIS, R.J. **The History of Allelopathy**. Netherlands, Springer, 2007. 316 p.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Edited by Wink M. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

WONG, W.H.; KASAI, R.; CHOSHI, W.; NAKAGAWA, Y.; MIZUTANI, K.; OHTANI, K.; TANAKA, O. Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus delavay*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2699-2702, 1991.

WOODWARD, S.L. **Introduction to biomes**. Greenwood, Westport, 2008.

YAGHOOBI-ERSHADI, M.R.; AKHAVAN, A.A.; JAHANIFARD, E.; VANTANDOOST, H.; AMIN, G.H.; MOOSAVI, L.; RAMAZANI, A.R.Z.; ABDOLI, H.; ARANDIAN, M.H. Repellency effect of Myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. **Iranian Journal Public Health**, v. 35, p. 7-13, 2006.

YANG, G-Q.; WAN, F-H.; GUO, J-Y.; LIU, W-X. Cellular and ultrastructural changes in the seedling roots of upland rice (*Oryza sativa*) under the stress of two allelochemicals from *Ageratina adenophora*. **Weed Biology and Management**, v. 11, p. 152-159, 2011.

YANG, C.R., ZHANG, Y., JACOB, M.R., KHAN, S.I., ZHANG, Y.J., AND LI, X. C. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1710-1714, 2006.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 1-7, 2008.

# CAPÍTULO I

**Influência de extratos aquosos de folha e caule de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. sobre diásporos e plântulas de diferentes espécies cultivadas**

**RESUMO** – *Serjania lethalis* A. St.-Hil. é uma liana abundante em áreas de cerrado e devido ao seu hábito e distribuição é uma espécie que interfere no crescimento de outras espécies arbóreas e arbustivas. Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as estratégias de dominância dessa espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar e quantificar o potencial fitotóxico de *S. lethalis* em função de diferentes órgãos da planta. O efeito dos extratos aquosos de folha e caule foi avaliado sobre a germinação de diásporos e crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.). O extrato aquoso foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal para 1000 mL de água destilada, produzindo-se uma maceração de 10% (m/v). A partir deste, foram feitas diluições em água destilada para 7,5; 5,0 e 2,5%. Os diásporos e plântulas de rabanete e gergelim foram mais afetados pelo extrato foliar, enquanto o trigo pelo extrato caulinar. As principais anomalias foram registradas no sistema radicular das espécies alvo e os extratos reduziram em mais de 50% o tamanho das células do metaxilema das raízes de gergelim. As espécies alvo responderam de maneira distinta aos extratos, sendo que para todas as variáveis analisadas as espécies de eudicotiledôneas (rabanete e gergelim) foram mais sensíveis do que a monocotiledônea (trigo); exceto para parte aérea das plântulas de trigo, na qual foram registradas as maiores reduções de crescimento. Portanto *S. lethalis* pode inibir a germinação e o crescimento de outras plantas no ambiente, o que forneceria uma vantagem competitiva para a espécie e, conseqüentemente, contribuiria para a sua dominância.

**Palavras-chave:** fitotoxicidade, cipó-timbó, gergelim, rabanete, trigo, germinação, crescimento.

**ABSTRACT** – (Influence of aqueous extracts of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. leaf and stem on diaspores and seedlings of different crop species). *Serjania lethalis* A. St.-Hil. is an abundant liana in cerrado areas and due to their habit and distribution is a species that interferes on the growth of other tree and shrub species. In order to increase knowledge about the dominance strategies of this species, the aim of this study was to evaluate and quantify the phytotoxic potential of *S. lethalis* for different plant organs. The effect of aqueous extracts of leaf and stem was evaluated on diaspore germination and seedling growth of sesame (*Sesamum indicum* L.), radish (*Raphanus sativus* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.). The aqueous extract was prepared in a proportion of 100 g plant material dissolved in 1000 mL of distilled water, resulting in 10% maceration. The dilutions were made with distilled water to 7.5, 5.0 and 2.5%. The diaspores and seedlings of radish and sesame were more affected by leaf extract, while wheat by stem extract. Main anomalies were observed in the root system of the target species and the extracts reduced in more than 50% the average size of the metaxylem cells of the sesame roots. The target species responded differently to the extracts, and the species of eudicotyledonous (radish and sesame) were more sensitive than the monocotyledonous (wheat) for all variables analyzed; except for shoots of wheat seedlings, in which the largest reductions in growth were recorded. Therefore, *S. lethalis* could inhibit the germination and growth of other plants in the environment, which would provide a competitive advantage to the species, and consequently contribute to its dominance.

**Keywords:** phytotoxicity, cipó-timbó, sesame, radish, wheat, germination, growth.

## 1. Introdução

O Cerrado brasileiro ocupa 23% do território nacional (Ribeiro e Walter, 2008) e apresenta grande diversidade de espécies e fitofisionomias (Ribeiro e Walter, 2008; Batalha, 2011). Com uma degradação estimada em 78,7% da paisagem original (Conservation International, 2010; Oliveira, 2011), recentes esforços vêm sendo realizados para a manutenção e conservação dessa biodiversidade. Estudos fitosociológicos (Ribeiro et al., 1985; Batalha e Mantovani 2001; Fonseca e Silva-Júnior, 2004; Felfili et al., 2004; Carvalho et al., 2008; Aquino et al., 2014) e ecofisiológicos (Sasaki et al.; 1999; Dorneles et al., 2005; Mendes-Rodrigues et al., 2011; Dorneles et al., 2013; Braga Filho et al., 2014) foram realizados em várias regiões de Cerrado. Entretanto, a conservação e o uso sustentável dessas áreas dependem ainda de conhecimentos básicos sobre as interações ecológicas e a adaptação das espécies ocorrentes nesse ecossistema.

A alelopatia é responsável pelas interações interespecíficas e intraespecíficas, na estabilização e dinâmica da comunidade (Aires, 2005). Os aleloquímicos são geralmente compostos secundários produzidos pelas plantas e liberados no ambiente por lixiviação, volatilização, decomposição e exudados da raiz (Inderjit e Dakshini, 1994). Esses compostos podem estar presentes em todas as partes das plantas, porém sua distribuição não é uniforme, podendo variar em qualidade e quantidade nos diferentes órgãos da planta e ao longo do tempo (Harbone, 1993; Weir et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2010). Os metabólitos secundários pertencem a diferentes classes químicas (Narwal e Sampietro, 2009), destacando-se três categorias principais, especificamente terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Taiz e Zeiger 2010; Gleason 2012; Reigosa et al., 2013).

A ação desses aleloquímicos pode ser direta, como as alterações celulares e metabólicas, ou indireta, incluindo alterações sobre os organismos que habitam o solo e têm efeito sobre propriedades e características nutricionais de outras plantas (Reigosa et al., 1999). A ação fitotóxica destes compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são consequências secundárias de efeitos ocorridos anteriormente a nível molecular e celular, provocando distúrbios celulares generalizados e que agem em diversos locais de interferência (Ferreira e Áquila, 2000; Narwal e Sampietro, 2009). Quando as sementes são expostas aos aleloquímicos, a germinação pode ser inibida e, se esta ocorrer, as plântulas podem apresentar crescimento, desenvolvimento ou metabolismo anormal. Os principais efeitos observados são atraso no tempo de germinação, atrofia e espessamento da raiz, redução do crescimento radicular e do hipocótilo, redução do número de raízes secundárias e ausência da raiz primária (Gatti et al., 2010; Gusman et al., 2011; Grisi et al., 2012; Silvestre et al., 2013).

A família Sapindaceae abrange 2000 espécies distribuídas entre 140 a 150 gêneros, apresentando vasto potencial econômico devido as mais diferentes formas de utilização de suas espécies. Além disso, essa família é uma fonte rica de isoprenóides, polifenóis, saponinas, triterpenos, diterpenos, flavonóides, lectinas e hidrogéis (Gorin et al., 1996; Mahmoud et al., 2001; Ortega et al., 2001; Freire et al., 2002; Voutqne et al., 2002; Lima et al., 2006; Pelegrini et al., 2008). *Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae), comumente chamada de cipó-timbó, é uma liana abundante no cerrado, com ocorrência no sudeste e sul do Brasil (Fernandes e Negreiros, 2001). O cipó-timbó é tradicionalmente utilizado contra inflamações, doenças infecciosas e cutâneas, tais como úlcera, diarreia, febre e malária (Cruz, 1979; Napolitano et al., 2005) e, também pela sua ação piscicida (Balbach, 1963), larvicida (Rodrigues et al., 2006) e anti-bacteriana (Lima et al., 2006). Estudos realizados com extratos etanólicos da folha e caule de *S. lethalis* revelaram a sua capacidade de atuar como agente imunomodulador e antiinflamatório (Napolitano et al., 2005). Embora se conheça a composição fitoquímica de *S. lethalis* e, seus efeitos como propriedades farmacológicas, poucos trabalhos examinaram o potencial fitotóxico da espécie.

Dessa forma, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as estratégias de dominância dessa espécie, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e quantificar o potencial fitotóxico de *S. lethalis* em função de diferentes órgãos da planta, utilizando bioensaios de germinação e crescimento de plântulas de espécies cultivadas em laboratório.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Preparação dos extratos**

Folhas maduras (coloração verde-escura e textura coriácea) e caules de *S. lethalis* foram coletadas na área de reserva de cerrado “*senso strictu*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no município de São Carlos-SP (21° 58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), em maio de 2011. Um exemplar da espécie foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com o voucher HUFSCar 8340. A região é caracterizada pelo tipo climático Aw, segundo o sistema de classificação de Köppen (1948), considerado tropical úmido com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (Ribeiro e Walter, 2008).

Após a coleta, as folhas e caules foram secos em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, durante 72 h, e trituradas em moinho industrial (Mesh 14). Posteriormente, o material foi pesado, embalado a vácuo em sacos plásticos e armazenado sob temperatura ambiente (25 °C), até a

realização dos experimentos. O extrato aquoso bruto foi preparado a partir da mistura do material vegetal seco (pó) com água destilada em concentração de 10% de massa/volume (g/mL). O extrato permaneceu em repouso, no escuro, durante 12 h a 4 °C e em seguida foi filtrado a vácuo, utilizando-se uma bomba elétrica acoplada a um funil de Buckner forrado internamente com papel de filtro (Gatti et al., 2004). O extrato resultante foi recolhido em um béquer e, a partir dele, foram feitas diluições com água destilada para 7,5; 5,0 e 2,5%.

## 2.2. Potencial osmótico e pH dos extratos

O pH dos extratos foi medido com o peagâmetro Analion, modelo PM608, e a concentração molar, com o osmômetro automático ( $\mu$ Osmotte, modelo 5004), calculando-se posteriormente o potencial osmótico dos extratos de folhas e caules na maior concentração (10%).

Os valores da concentração molar foram convertidos para pressão osmótica (25 °C) pela conversão de mOsm/Kg para MPa, segundo a equação 1.1 citada por Larcher (2004):

$$1\text{Osm/Kg} = 0,00832 \times T_{\text{abs}}, \quad (\text{eq. 1.1})$$

onde:

$T_{\text{abs}}$ : temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

Para avaliar o efeito osmótico dos extratos obtidos, foi realizado bioensaios de germinação e crescimento com diásporos de gergelim, rabanete e trigo em soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) a -0,10; -0,20 e -0,25 MPa, além do controle (0 MPa), segundo recomendações de Villela et al. (1991). O experimento foi realizado utilizando-se a mesma metodologia descrita para os bioensaios de germinação e crescimento.

## 2.3. Bioensaio de germinação

As quatro concentrações obtidas a partir do extrato aquoso de folhas e caules de *S. lethalis* foram aplicadas nos diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*, Pedaliaceae), rabanete (*Raphanus sativus*, variedade Vip Crimson, Brassicaceae) e trigo (*Triticum aestivum*, cultivar BRS 264, Poaceae).

O bioensaio de germinação foi conduzido em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL do extrato ou água destilada (tratamento controle). Cada placa foi coberta por uma película de plástico transparente, para evitar evaporação, sendo tampadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 30 diásporos. O experimento foi instalado em câmara de germinação (B.O.D.) a 25 °C para os diásporos de rabanete (Borella et al., 2012) e trigo (Silva et al., 2008) e, a 28 °C para as

sementes de gergelim (Gatti et al., 2010), sob fotoperíodo de 12 h. As leituras foram realizadas a cada 12 h, durante os sete primeiros dias, e em intervalos de 24 h, até a estabilização da germinação, adotando-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação (Labouriau, 1983).

Foram avaliadas as medidas de germinabilidade, tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia (Ranal e Santana, 2006), cujas expressões matemáticas seguem abaixo:

**a) germinabilidade ou porcentagem de germinação (G)**, expressa pela equação 1.2:

$$G = \frac{\sum n_1}{n} 100, \quad (\text{eq. 1.2})$$

onde:

$n_1$ : número de diásporos que germinam no tempo  $t_i$ ;

$n$ : número total de diásporos.

**b) tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ )**, calculado pela expressão proposta por Labouriau (1983):

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}, \quad (\text{eq. 1.3})$$

em que:

$t_i$ : tempo entre o início do experimento e a  $i$ ésima observação (horas);

$n_i$ : número de diásporos que germinam no tempo  $t_i$ ;

$k$ : último tempo de germinação dos diásporos.

**c) velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ )** (Labouriau, 1983), calculada como:

$$\bar{v} = \frac{1}{\bar{t}}, \quad (\text{eq. 1.4})$$

onde:

$\bar{t}$ : tempo médio de germinação.

**d) velocidade de germinação (VG)**, proposta por Maguire (1962), é uma ferramenta para avaliar o vigor das sementes, cuja expressão matemática que associa número de diásporos germinados e tempo é dada por:

$$VG = \frac{\text{número de diásporos germinados}}{\text{dias até a primeira contagem}} + \dots + \frac{\text{número de diásporos germinados}}{\text{dias até a última contagem}} \quad (\text{eq. 1.5})$$

**e) incerteza (I)**, proposta por Labouriau e Valadares (1976) para analisar a incerteza associada à distribuição da frequência relativa de germinação como,

$$I = - \sum_{i=1}^K f_i \log_2 f_i, \quad (\text{eq. 1.6})$$

Sendo  $f_i = n_i / \sum_{i=1}^k n_i$ , onde:

$f_i$ : frequência relativa de germinação;

$n_i$ : número de diásporos germinados no dia  $i$ ;

$k$ : último dia de observação.

**f) sincronia ( $Z$ )** do processo de germinação (Ranal e Santana, 2006), calculada pela expressão:

$$Z = \sum C_{n_i,2} / N, \quad (\text{eq. 1.7})$$

Sendo,  $C_{n_i,2} = n_i(n_i - 1)/2$  e  $N = \sum n_i(\sum n_i - 1)/2$ , onde:

$C_{n_i,2}$ : combinação de diásporos germinados no tempo  $i$ , dois a dois;

$n_i$ : número de diásporos germinados no tempo  $i$ .

O termo diásporo foi utilizado ao longo do texto para designar todos os tipos de unidades de dispersão estudadas. Quando o trigo foi referido, utilizou-se o nome específico de seu diásporo, no caso, uma cariopse. O termo semente foi utilizado para a unidade de dispersão de gergelim e rabanete.

## 2.4. Bioensaio de crescimento de plântulas

Na análise de crescimento de plântulas de gergelim, rabanete e trigo, as unidades de dispersão foram previamente germinadas em água destilada. Plântulas com 3 mm de raiz primária foram transferidas para caixas de plástico transparente (15 x 10 x 5 cm), contendo como substrato duas folhas de papel de filtro umedecido com 8 mL de água destilada (controle) ou extratos de folhas e caules, nas mesmas concentrações adotadas para o teste de germinação.

As caixas foram tampadas e mantidas em B.O.D. a 25 °C para os diásporos de rabanete e trigo e, a 28 °C para as sementes de gergelim, sob fotoperíodo de 12 h. Utilizaram-se quatro repetições de 10 plântulas, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após sete dias do transplântio, foram avaliados o comprimento inicial das plântulas e a presença de anomalias. O comprimento da parte aérea (do colo até o meristema caulinar) e da raiz primária (do colo até o meristema radicular) foi medido com auxílio de um paquímetro digital. As plântulas foram classificadas em normais e anormais, de acordo com as especificações de Brasil (2009), sendo consideradas anormais aquelas que não mostraram potencial para continuar o seu desenvolvimento,

com o sistema radicular ou a parte aérea apodrecidos, necrosados, ausentes ou totalmente atrofiados.

## **2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema)**

Plântulas de gergelim cresceram em soluções do controle e do extrato aquoso de folhas e caules de *S. lethalis*, nas mesmas condições adotadas para o bioensaio de crescimento. Decorrido quatro dias, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, o segmento da raiz primária foi removido e imerso em álcool 70% (v/v) (Gatti et al., 2010).

A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997). As raízes ficaram imersas em álcool (70%), durante cinco dias, e depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25%) a 60 °C, durante 48 h, período em que foi observado a clarificação do material.

Em seguida, o material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina ( $C_{20}H_{19}N_4C_1$ ) e soda cáustica (NaOH a 10%), e transferido para estufa, a 60 °C, por 24 h. Após a coloração, a raiz foi fixada em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro repetições de raízes primárias crescidas em diferentes concentrações dos extratos e no controle. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, da região central em direção ao colo (Gatti et al., 2010), no aumento de 20 vezes. A partir dessas fotos, foram medidas até 15 células centrais do metaxilema, utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0.

## **2.6. Análise estatística**

Os dados obtidos para cada uma das características avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando essas duas pressuposições foram atendidas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. A falta de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização dos testes não-paramétricos, Kruskal-Wallis seguido de Dunn para comparações binárias, a 0,05 de significância.

Procedeu-se à regressão linear ou quadrática, quando o resultado da ANOVA foi significativo. A qualidade do ajuste dos modelos foi aferida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ); porém, em situações onde não foi possível o ajuste dos modelos ( $R^2$  inferior a 70%), os valores foram inseridos em uma tabela, sem representação gráfica. As variáveis que não apresentaram

diferenças significativas entre os tratamentos foram representadas nas figuras com os valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Para comparação dos efeitos ocasionados pelos diferentes órgãos de *S. lethalis*, foi realizada a análise conjunta para as características em que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes, 1990). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2003) e SPSS 16.0.

### 3. Resultados

#### 3.1. Bioensaios de germinação e crescimento de plântulas

O extrato aquoso das folhas de *S. lethalis* apresentou potencial fitotóxico, inibindo, principalmente, o processo de germinação das sementes de rabanete. A germinabilidade dos diásporos de trigo, gergelim e rabanete sofreram redução linear de 0,83; 1,26 e 9,16%, respectivamente, para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato foliar. O extrato aumentou linearmente o tempo médio de germinação e, em contrapartida, promoveu decréscimo linear na velocidade de germinação de Maguire (0,55 h e 0,0171 cariopses h<sup>-1</sup> para trigo; 2,65 h e 0,094 sementes h<sup>-1</sup> para gergelim e, 4,51 h e 0,1194 sementes h<sup>-1</sup> para rabanete, para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato adicionado). Para as sementes de gergelim, a incerteza sofreu aumento linear de 0,1072 bits, enquanto a sincronia foi reduzida linearmente em 0,0234 para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato foliar. A incerteza e a sincronia do processo de germinação das sementes de rabanete atingiram seus valores máximo (2,48) e mínimo (0,0893 bits) nas concentrações estimadas de 5,1 e 7,9%, respectivamente (Figura 1).

O extrato aquoso do caule de *S. lethalis* também exerceu efeito inibitório significativo no processo de germinação das espécies cultivadas. Na avaliação da germinabilidade, a espécie alvo menos sensível foi o trigo, sendo que o extrato caulinar interferiu apenas no tempo e na velocidade de germinação dessas cariopses (Figura 2 e Tabela 1). Para as sementes de gergelim, houve decréscimo linear na germinabilidade, na velocidade média e na velocidade de germinação de Maguire (0,90%; 0,0021 h<sup>-1</sup> e 0,079 sementes h<sup>-1</sup> para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato), enquanto o tempo médio de germinação e a incerteza tiveram acréscimo linear de 1,48 h e 0,0663 bits para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato caulinar, respectivamente. Os valores referentes à sincronia do processo de germinação das sementes de gergelim tratadas com extrato do caule não apresentaram ajuste linear ou quadrático, com menores médias nas concentrações 5; 7,5 e 10% (Tabela 1). O rabanete foi a espécie mais sensível aos tratamentos no bioensaio de germinação. O extrato caulinar reduziu linearmente a germinabilidade e a velocidade de germinação de Maguire (7,23% e 0,0948 sementes h<sup>-1</sup> para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato) das sementes de rabanete,

enquanto o tempo e a velocidade média de germinação atingiram seus valores máximo (78,13 h) e mínimo (0,0101 h<sup>-1</sup>) nas concentrações estimadas de 9,10 e 8,67%, respectivamente. A incerteza do processo de germinação das sementes de rabanete apresentou maior índice (2,70 bits) na concentração estimada de 5,60% e sincronia mínima (0,0965) na concentração 9% (Figura 2).

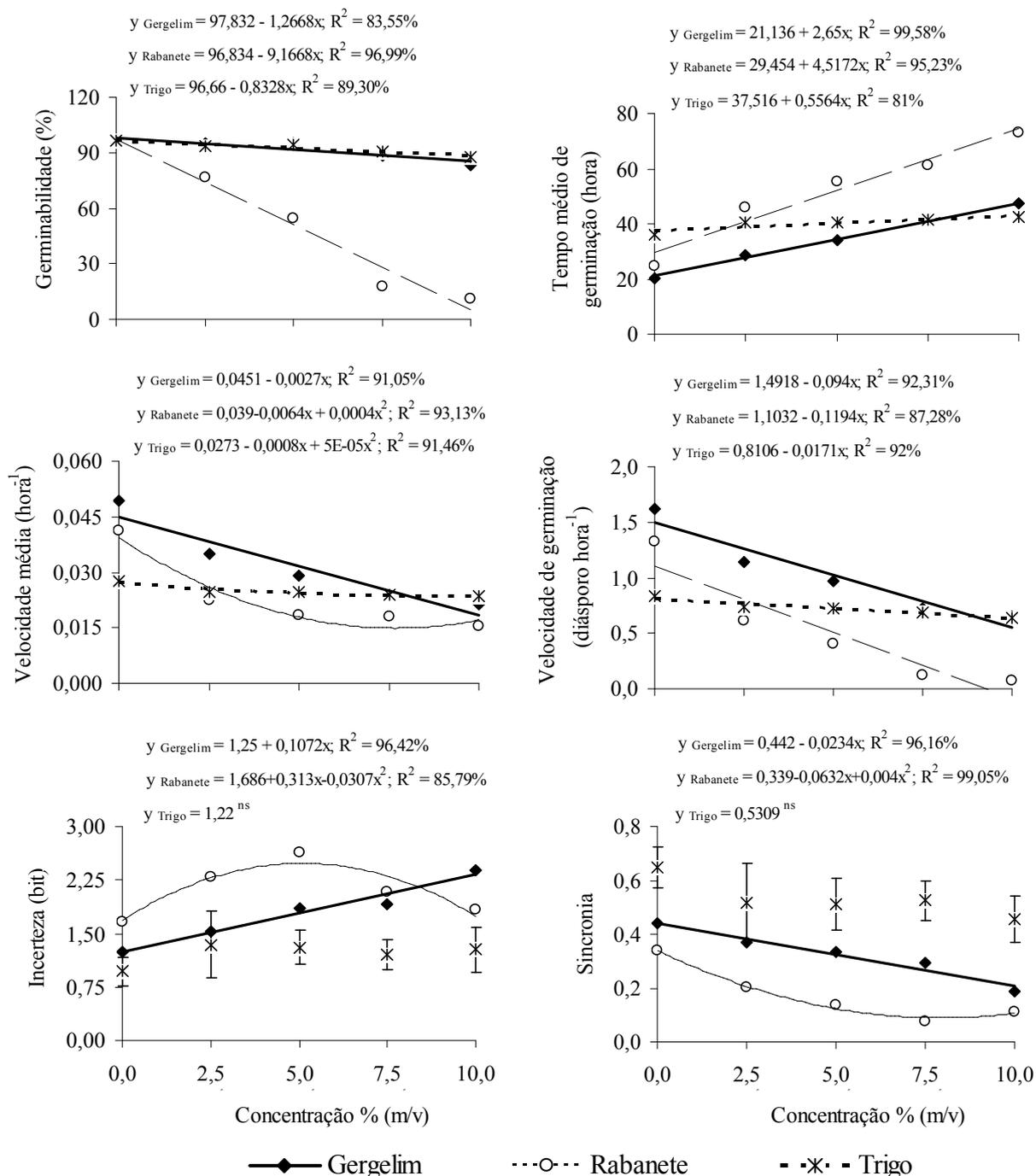


Figura 1. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de folha de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

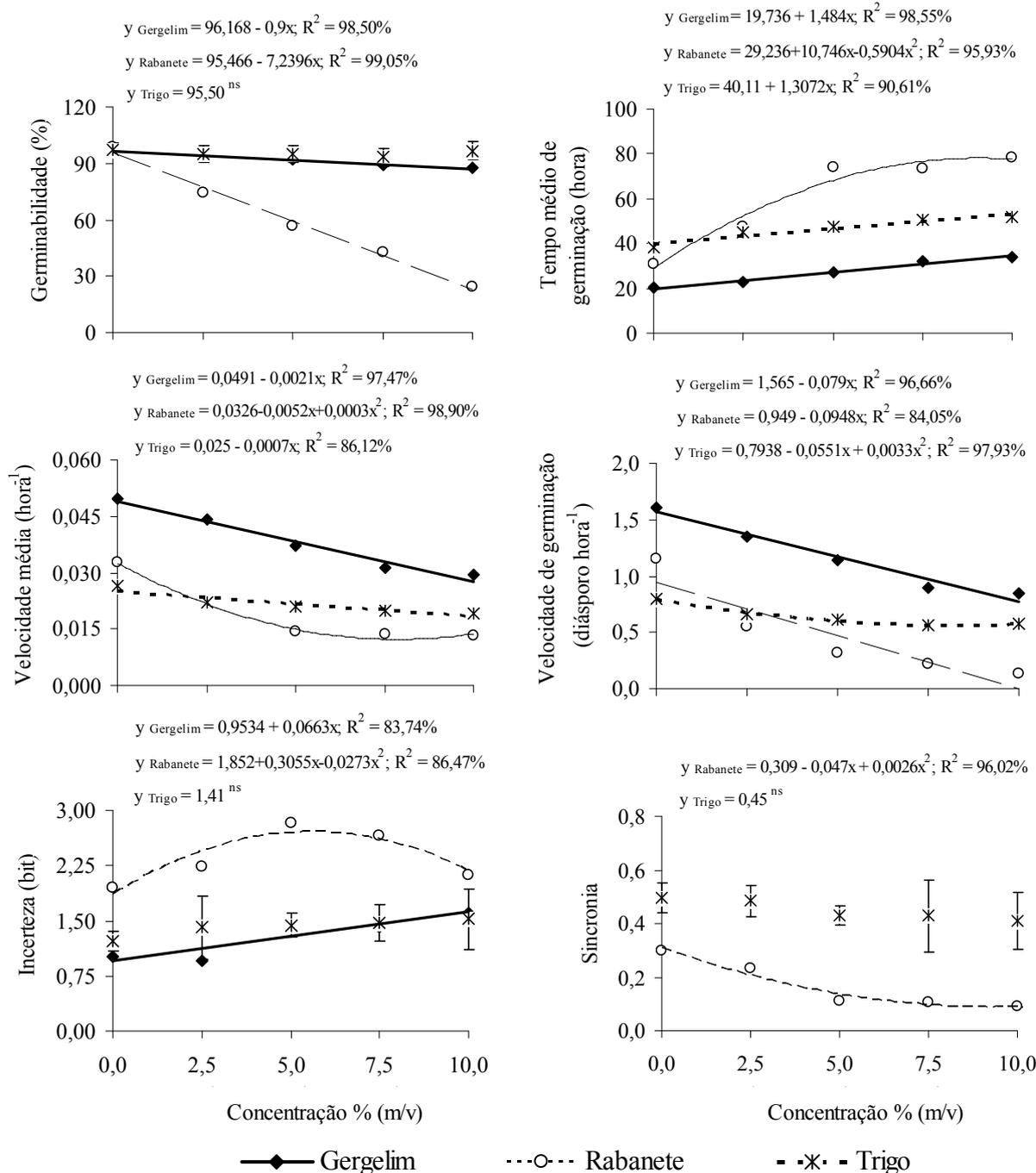


Figura 2. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

No bioensaio de crescimento, a ausência de plântulas normais de rabanete e gergelim, submetidas à ação do extrato aquoso de folhas de *S. lethalis*, pode ser notada a partir da concentração 7,5 e 10%, respectivamente. As plântulas normais de trigo sofreram decréscimo linear de 6,8% para cada adição de  $0,01 \text{ g mL}^{-1}$  de extrato foliar. O comprimento da parte aérea das

plântulas de rabanete (7,62 mm) e gergelim (10,60 mm) foi mínimo nas concentrações estimadas de 8,18 e 7,62%, respectivamente; enquanto o trigo foi a espécie alvo que apresentou maior redução no comprimento da parte aérea, com diminuição linear de 7,02 mm para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato adicionado. Para as eudicotiledôneas estudadas, o comprimento radicular foi fortemente inibido pelos extratos foliares, com valores nulos nas concentrações 6,91% (rabanete) e 7,05% (gergelim). O menor comprimento da raiz das plântulas de trigo (19,38 mm) foi registrado na concentração 8,04% (Figura 3).

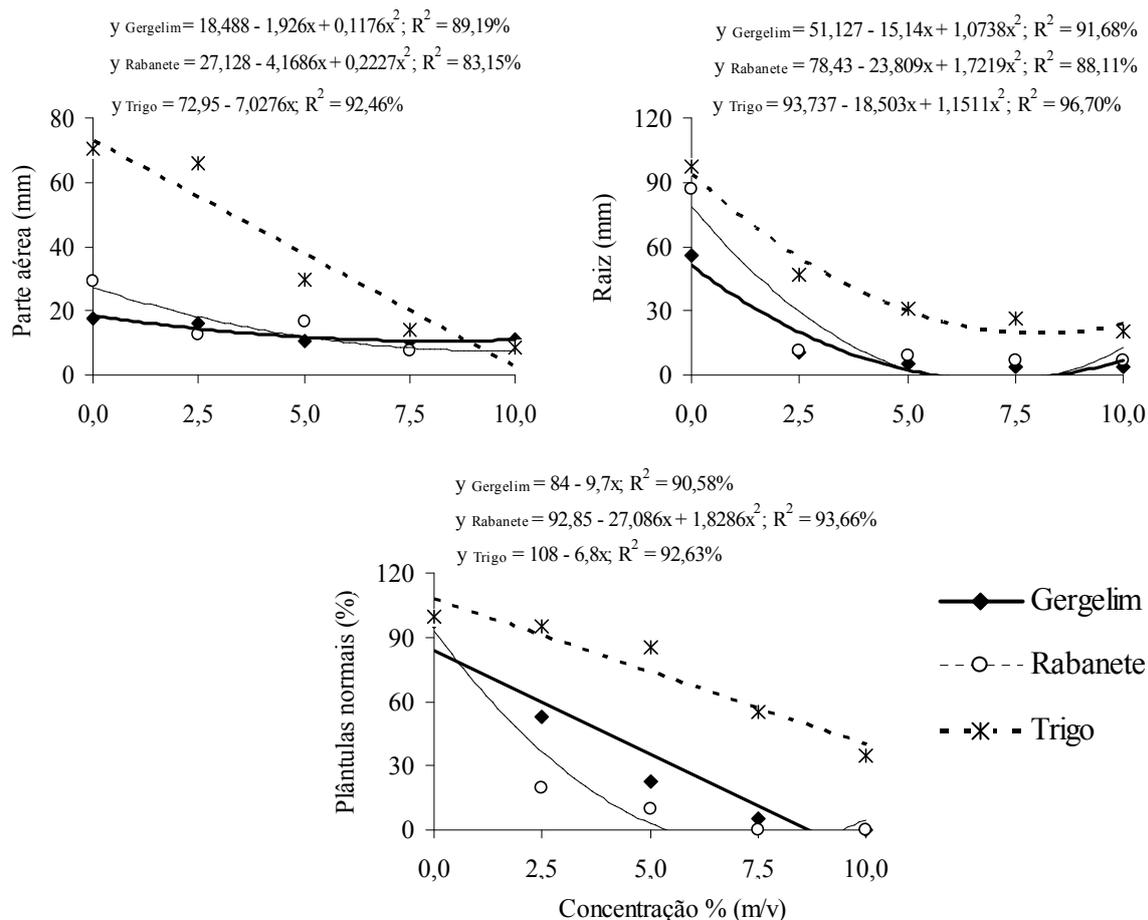


Figura 3. Efeito dos extratos de folha de *Serjania lethalis*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

O extrato aquoso do caule de *S. lethalis* também interferiu no crescimento das plântulas receptoras. A porcentagem de plântulas normais de rabanete e gergelim, submetidas à ação do extrato caulinar, foi nula a partir da concentração 5 e 7,5%, respectivamente. Para o trigo, verificou-se diminuição linear de 8,5% de plântulas normais para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato. A maior redução no comprimento da parte aérea e da raiz foi também registrada para as plântulas de trigo e rabanete, respectivamente. Para as plântulas de gergelim, o comprimento da parte aérea sofreu

decréscimo linear de 1,60 mm para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato; enquanto o trigo (7,31 mm) e o rabanete (19,74 mm) apresentaram menores comprimentos nas concentrações 7,31 e 5,66%, respectivamente. O comprimento radicular das plântulas de rabanete (nulo), gergelim (0,25 mm) e trigo (8,59 mm) apresentaram, respectivamente, valores mínimos nas concentrações estimadas de 6,90; 7,28 e 7,10% (Figura 4).

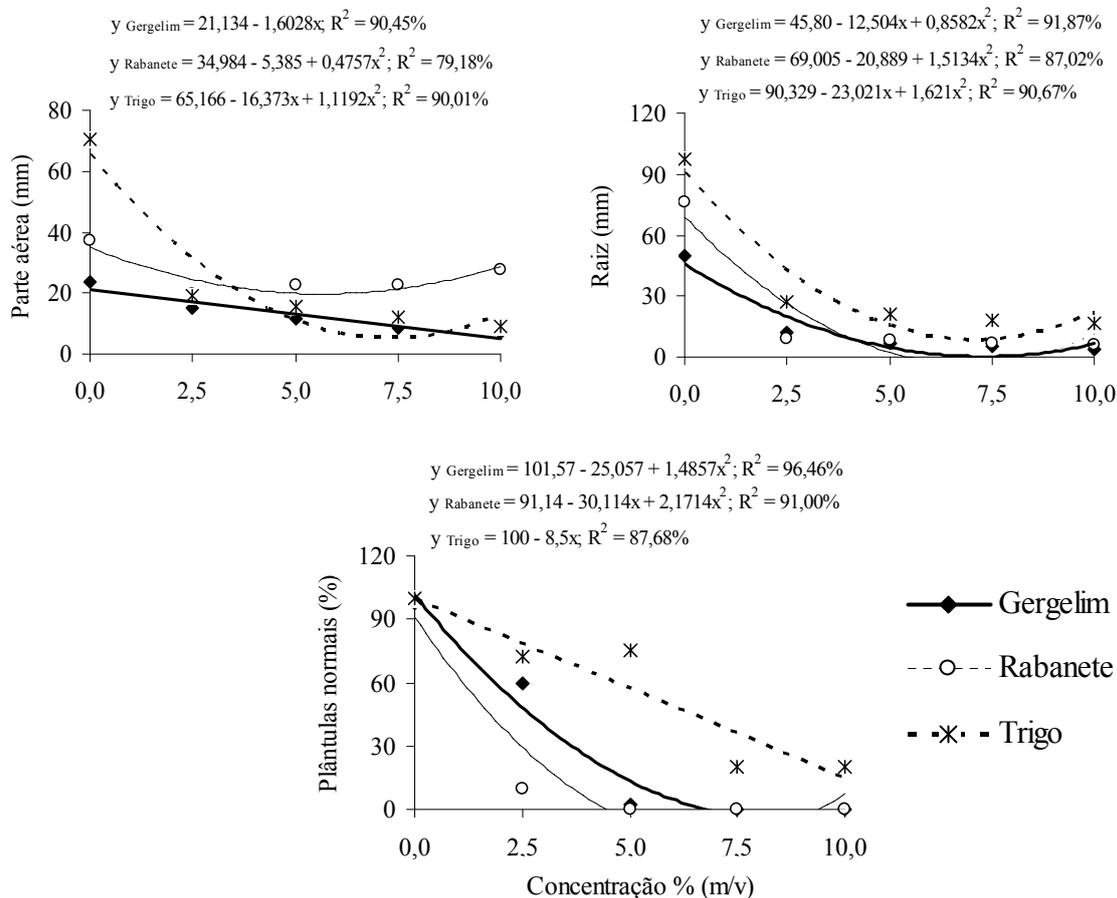


Figura 4. Efeito dos extratos de caule de *Serjania lethalis*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

Para as plântulas de eudicotiledôneas (gergelim e rabanete) submetidas à ação dos extratos de folha e caule de *S. lethalis*, a relação entre o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz foi hiperalométrica (gergelim:  $b_{\text{folha}} = 0,0393$  e  $b_{\text{caule}} = 0,0246$ ; rabanete:  $b_{\text{caule}} = 0,2084$ ), enquanto para a monocotiledônea (trigo) foi hipoalométrica ( $b_{\text{folha}} = -0,0475$  e  $b_{\text{caule}} = -0,0161$ ); ou seja, o comprimento da parte aérea das plântulas de trigo foi menor que o comprimento da raiz (Figura 5). As plântulas crescidas nos extratos apresentaram algum tipo de anormalidade, sendo que as principais anomalias foram registradas no sistema radicular, onde as raízes se apresentaram atrofiadas, curtas, necrosadas e com inversão gravitópica (Figura 6). Algumas plântulas,

principalmente de rabanete e trigo, apresentaram também desenvolvimento precoce das raízes secundárias. Parte aérea curta, com hipocótilo curvado, retorcido e deteriorado, em alguns casos, ausentes (rabanete) foram as alterações mais comuns observadas na parte aérea (Figura 6).

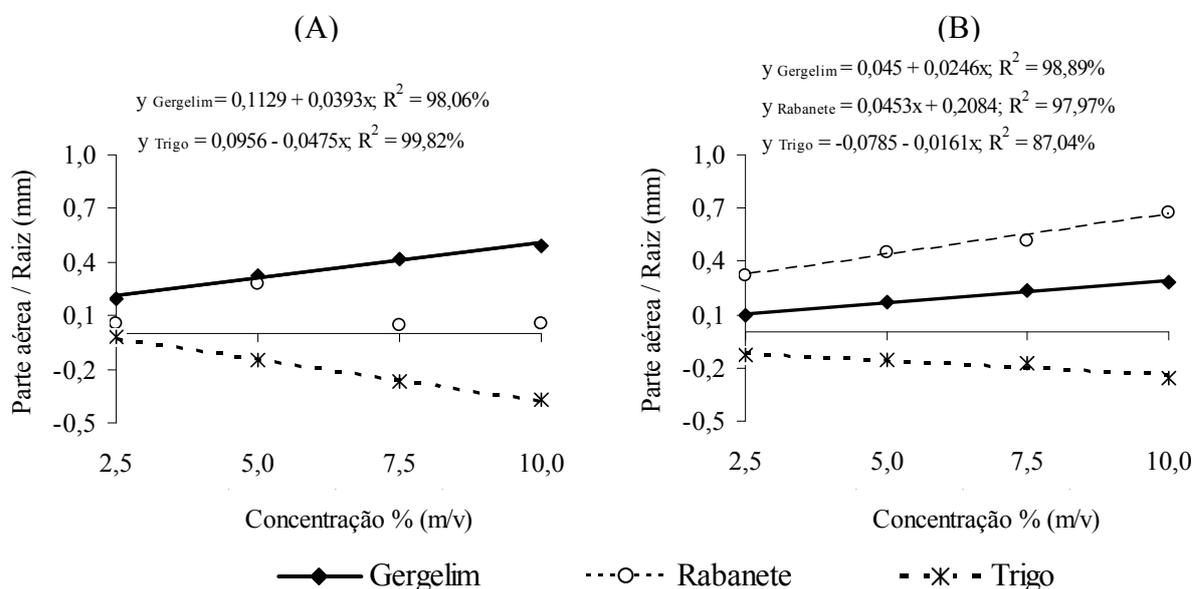


Figura 5. Relação entre o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz em plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*), submetidas à ação dos extratos de folha (A) e caule (B) de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações (variável do eixo y em escala logarítmica).

Por meio da análise conjunta foi possível comparar os resultados obtidos a partir dos diferentes órgãos de *S. lethalis*. Os extratos de folha e caule exerceram efeitos inibitórios similares na germinabilidade e em todos os parâmetros analisados no bioensaio de crescimento das plântulas de gergelim; para as demais variáveis, o extrato foliar foi o que mais inibiu o processo de germinação dessas sementes. Para o rabanete, o extrato das folhas foi o que provocou maior efeito inibitório na germinabilidade e no crescimento da parte aérea das plântulas; enquanto para as sementes semeadas no extrato do caule, a germinação ocorreu de forma mais lenta. A germinabilidade das cariopses de trigo foi mais afetada pelo extrato foliar; porém, o extrato caulinar apresentou potencial para aumentar o tempo médio e reduzir a velocidade média e o índice de velocidade de germinação. O extrato do caule também exerceu maior efeito inibitório no crescimento das plântulas de trigo (Tabela 2).

Os valores de pH obtidos para os extratos de folha e caule de *S. lethalis* variaram entre 6,55 e 6,13 e o potencial osmótico entre -0,22 e -0,21 MPa, respectivamente. A germinação dos diásporos e o crescimento das plântulas de gergelim, rabanete e trigo submetidos ao efeito de soluções de PEG 6000 a -0,10; -0,20 e -0,25 MPa não apresentaram diferenças significativas

quando comparadas com o tratamento controle (0 MPa). Assim, pode-se dizer que todos os resultados obtidos foram ocasionados pelo efeito fitotóxico dos extratos.

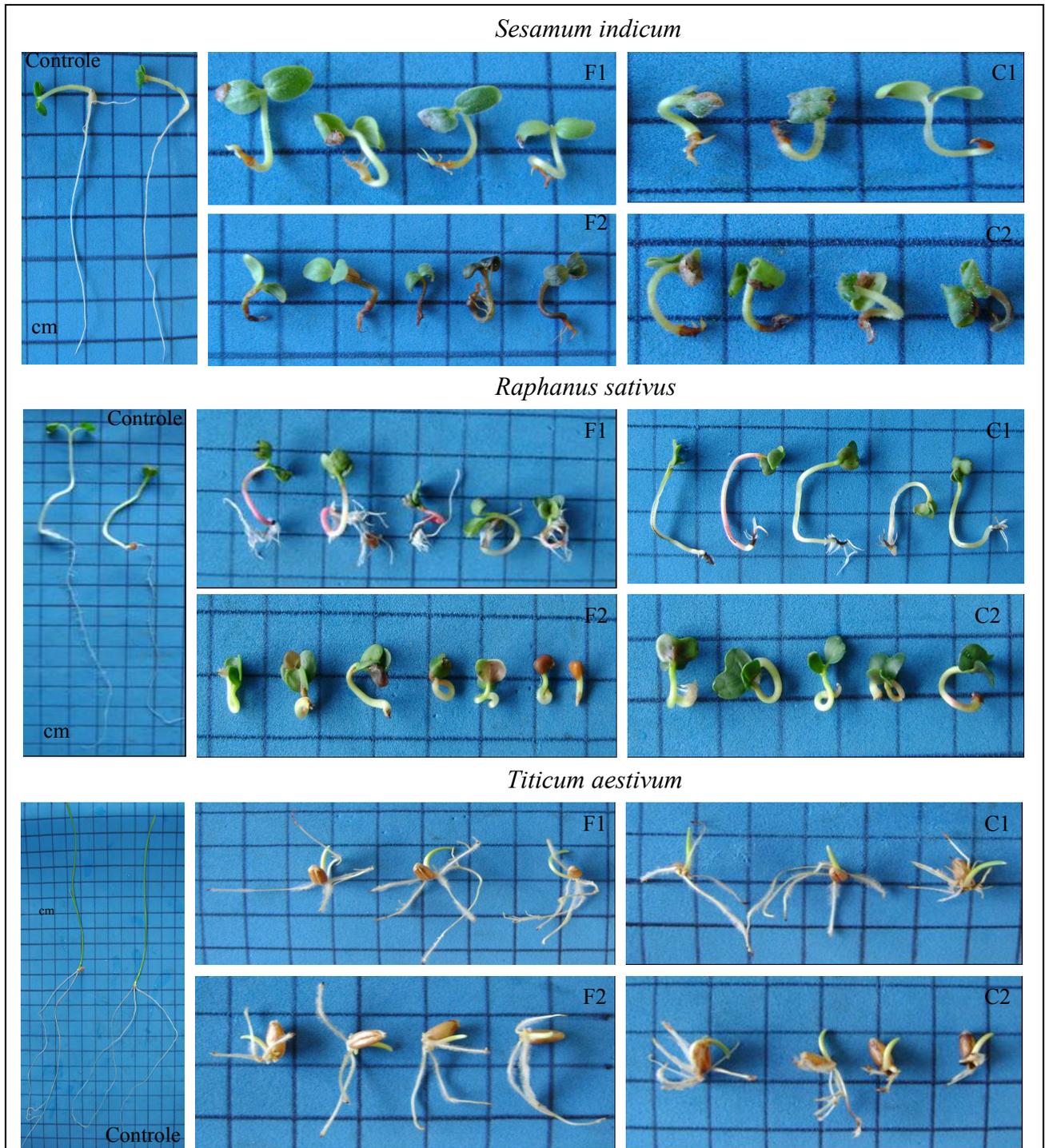


Figura 6. Anormalidades de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de folha (F) e caule (C) de *Serjania lethalis* nas concentrações 5% (1) e 10% (2). Escala = 1,0 cm.

Tabela 1. Germinação de diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos de folha e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Variáveis (unidades)	Extratos	Controle	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%	Estatística			
							<i>W</i> (P)	<sup>1</sup> <i>F</i> (P)	<sup>2</sup> <i>F</i> (P)	<i>H</i> (P)
<i>Sesamum indicum</i>										
<i>Z</i>	Caule	0,5169 ± 0,0208 b	0,6131 ± 0,0683 a	0,3906 ± 0,0355 c	0,3796 ± 0,0242 c	0,3373 ± 0,0461 c	<b>0,933</b> (0,180)	<b>2,124</b> (0,128)	<b>28,759</b> (0,000)	
<i>Triticum aestivum</i>										
<i>G</i> (%)	Caule	97,50 ± 3,19 a	95,00 ± 4,30 a	95,00 ± 4,30 a	93,33 ± 4,71 a	96,67 ± 4,71 a	0,830 (0,002)	<b>0,115</b> (0,975)		0,576 (0,6846)
<i>I</i> (bit)	Folha	0,9663 ± 0,2084 a	1,3437 ± 0,4629 a	1,3043 ± 0,2411 a	1,2001 ± 0,2137 a	1,2751 ± 0,3159 a	<b>0,965</b> (0,641)	<b>2,427</b> (0,093)	0,977 (0,4490)	
<i>I</i> (bit)	Caule	1,2192 ± 0,1348 a	1,4100 ± 0,4316 a	1,4409 ± 0,1648 a	1,4704 ± 0,2403 a	1,5236 ± 0,4128 a	<b>0,935</b> (0,192)	<b>1,686</b> (0,205)	0,586 (0,6780)	
<i>Z</i>	Folha	0,6495 ± 0,0761 a	0,5166 ± 0,1477 a	0,5100 ± 0,0961 a	0,5245 ± 0,0714 a	0,4539 ± 0,0867 a	<b>0,965</b> (0,654)	<b>2,287</b> (0,108)	2,088 (0,1331)	
<i>Z</i>	Caule	0,4970 ± 0,0573 a	0,4854 ± 0,0577 a	0,4310 ± 0,0353 a	0,4291 ± 0,1331 a	0,4086 ± 0,1071 a	<b>0,930</b> (0,156)	<b>3,122</b> (0,047)	0,811 (0,5375)	

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey ou Dunn a 0,05 de probabilidade; *G*: germinabilidade; *I*: incerteza; *Z*: sincronia; *W*: estatística do teste de Shapiro-Wilk; valores em negrito indicam que os resíduos seguem distribuição normal ( $P > 0,01$ ); <sup>1</sup>*F*: estatística do teste de Levene; valores em negrito indicam homogeneidade entre as variâncias ( $P > 0,01$ ); <sup>2</sup>*F*: estatística do teste de Snedecor; valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA;  $P < 0,05$ ); *H*: estatística do teste de Kruskal-Wallis, valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações ( $P < 0,05$ ); *P*: probabilidade.

Tabela 2. Efeito dos extratos de folha e caule de *Serjania lethalis* na germinação de diásporos e no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

Variáveis (unidades)	Extratos	
	Folha	Caule
<i>Sesamum indicum</i>		
G: germinabilidade (%)	91,50 a	91,67 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (h)	34,38 b	27,16 a
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação ( $h^{-1}$ )	0,0318 b	0,0384 a
VG: velocidade de germinação (semente hora <sup>-1</sup> )	1,02 b	1,17 a
I: incerteza (bit)	1,7879 b	1,2851 a
Z: sincronia	0,3251 b	0,4475 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	13,27 a	13,12 a
CR: comprimento da raiz (mm)	15,69 a	15,47 a
PN: plântulas normais (%)	35,50 a	32,00 a
CCM: Comprimento das células do metaxilema ( $\mu m$ )	72,46 a	67,97 a
<i>Raphanus sativus</i>		
G: germinabilidade (%)	50,99 b	58,67 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (h)	50,92 a	60,83 b
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação ( $h^{-1}$ )	0,0234 a	0,0191 b
VG: velocidade de germinação (semente $h^{-1}$ )	0,5060 a	0,4764 a
I: incerteza (bit)	2,1151 a	2,3584 a
Z: sincronia	0,1760 a	0,1630 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	14,64 b	25,90 a
CR: comprimento da raiz (mm)	23,97 a	21,32 a
PN: plântulas normais (%)	26,00 a	22,00 a
<i>Triticum aestivum</i>		
G: germinabilidade (%)	92,49 b	95,50 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (h)	40,30 a	46,65 b
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação ( $h^{-1}$ )	0,0249 a	0,0217 b
VG: velocidade de germinação (semente $h^{-1}$ )	0,7251 a	0,6422 b
I: incerteza (bit)	1,2179 a	1,1820 a
Z: sincronia	0,5309 a	0,5307 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	37,81 a	25,27 b
CR: comprimento da raiz (mm)	44,39 a	36,02 b
PN: plântulas normais (%)	74,00 a	57,50 b

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey a 0,05 de probabilidade.

### 3.2. Estudo anatômico das raízes de gergelim (células do metaxilema)

O estudo anatômico em raízes de plântulas de gergelim possibilitou uma melhor visualização dos efeitos fitotóxicos dos diferentes extratos de *S. lethalis* em nível celular. O grupo controle apresentou predomínio para as células pertencentes aos tamanhos entre 125-150  $\mu\text{m}$  (52,5%), não apresentando células menores que 100  $\mu\text{m}$ . As células do metaxilema das raízes de gergelim crescidas na presença dos extratos de folha e caule, nas concentrações 2,5; 5,0 e 7,5% apresentaram predominância na classe de tamanho entre 50-75  $\mu\text{m}$ . Na concentração 10% do extrato foliar e caulinar, 57,5 e 52,5% das células apresentaram respectivamente, tamanhos entre 25-50  $\mu\text{m}$  (Figuras 7 e 8).

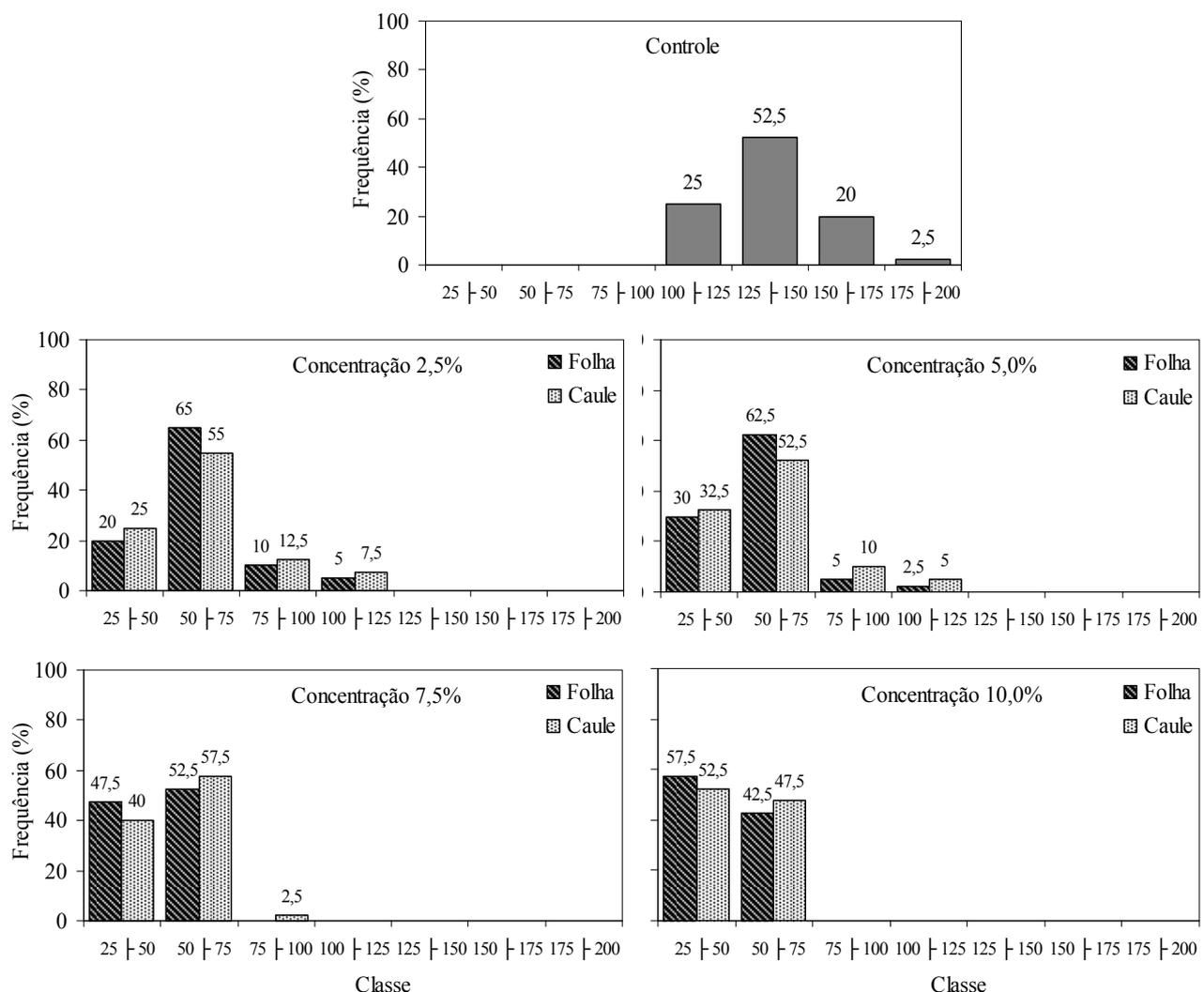


Figura 7. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folha e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

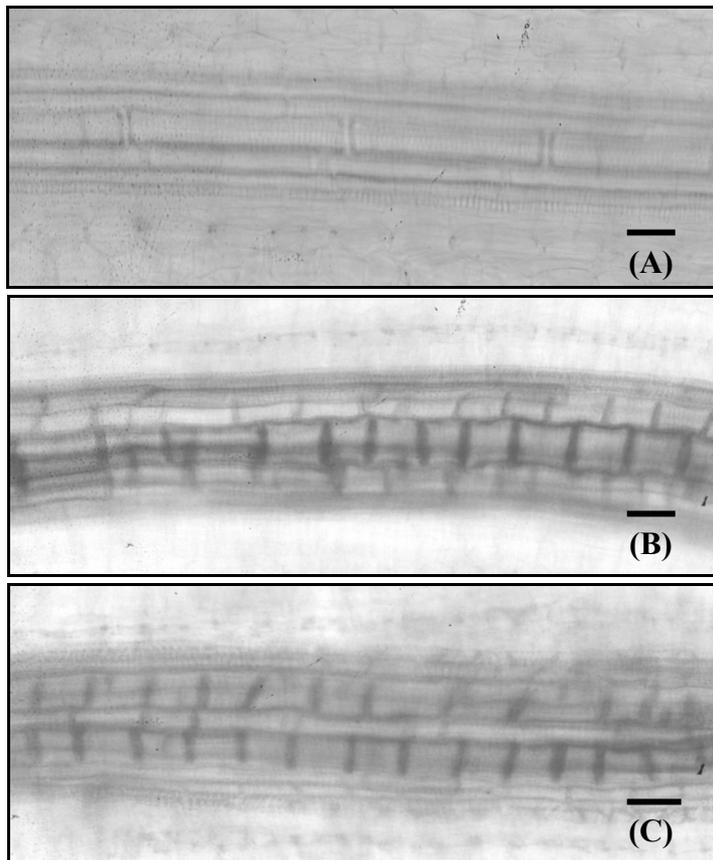


Figura 8. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do controle (A) e dos extratos de folha (B) e caule (C) de *Serjania lethalis* na concentração 10%. Escala = 50µm.

Não houve diferença significativa entre os extratos aquosos de folha e caule de *S. lethalis* para o comprimento das células do metaxilema das raízes de gergelim (Tabela 2), no entanto, esse efeito foi dependente da concentração. O menor comprimento dessas células foi registrado nas concentrações estimadas de 7,33 e 7,34% de extrato de folha (42,87 µm) e caule (37,55 µm), respectivamente (Figura 9).

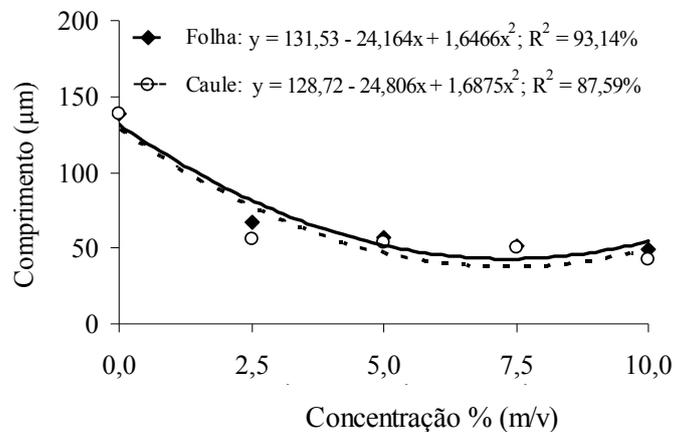


Figura 9. Comprimento (µm) das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

#### 4. Discussão

A avaliação do pH e do potencial osmótico dos extratos vegetais é fundamental quando se desconhece sua constituição de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, íons e outras moléculas. Valores extremos tanto de pH quanto de potencial osmótico dos extratos brutos desempenham efetivo papel aditivo no resultado geral, contribuindo para maior inibição da germinação e/ou do crescimento, o que significa não só superestimar os efeitos fitotóxicos, como, ainda, admitir a existência de alelopatia em casos onde não exista (Wardle et al., 1992; Souza-Filho et al., 2010; Reigosa et al., 2013). Dessa maneira, esses autores apontam para a necessidade de conhecer os efeitos do potencial osmótico para cada espécie, a fim de aquilatar com mais precisão as reais potencialidades do material em estudo. De acordo com Anese et al. (2014), extratos com potencial osmótico abaixo de -0,25 MPa não são hipertônicos para a germinação de diásporos de gergelim, rabanete e trigo. Assim, considerando que o pH e o potencial osmótico não interferiram no processo de germinação e no crescimento dessas espécies, pode-se afirmar que os efeitos inibitórios registrados foram ocasionados pela fitotoxicidade dos extratos de *S. lethalis*.

O efeito inibitório dos extratos de folha e caule de *S. lethalis* foi positivamente correlacionado com sua concentração, ou seja, aumentou com a concentração dos extratos. Além disso, os resultados mostraram que as espécies alvo respondem de maneira distinta aos extratos, sendo que para todas as variáveis analisadas as espécies de eudicotiledôneas (rabanete e gergelim) foram mais sensíveis do que a monocotiledônea (trigo); exceto para parte aérea das plântulas de trigo, na qual foram registradas as maiores reduções de crescimento. Diferenças de sensibilidade entre espécies alvo são comuns em trabalhos verificando alelopatia (Ma et al., 2011; Grisi et al., 2012; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2014; Walsh et al., 2014) e podem ser explicadas pelo fato dos mecanismos de absorção, translocação e o local de ação das fitotoxinas variarem entre as espécies (Magiero et al., 2009). Além disso, o maior efeito inibitório registrado sobre as sementes de rabanete pode estar relacionado com o tamanho de suas sementes, que são menores do que os diásporos das outras espécies estudadas, sendo, assim, menos tolerantes aos aleloquímicos. Segundo Imatomi et al. (2013), a interferência dos extratos sobre a germinação pode depender do tamanho, da estrutura e da permeabilidade do tegumento das sementes.

Extratos de *Andira humilis* Mart. ex Benth., *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., *Aristolochia esperanzae* Kuntze e *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., também plantas do cerrado, causaram inibição mais significativa no tempo do que na porcentagem de germinação de diversas espécies alvo (Oliveira et al., 2004; Periotto et al., 2004; Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013). Os efeitos fitotóxicos causados no processo de germinação não devem ser fundamentados somente no número final de sementes germinadas. Além desta variável, a velocidade, a homogeneidade, a sincronia de

germinação e o vigor das sementes são fatores que expressam o grau de organização ou desordem das reações químicas que ocorrem durante o processo germinativo e, estes dados devem ser analisados juntamente com a germinabilidade (Santana et al., 2006). Vários processos fisiológicos da semente podem ser afetados pela presença dessas fitotoxinas, os mais relatados foram a supressão das atividades de enzimas e/ou fitormônios, relacionados com a quebra do material de reserva que é fornecido ao embrião no momento de seu desenvolvimento inicial (Kato-Noguchi e Macias 2004; Singh et al. 2009) e, a inibição da absorção de água por meio de alterações na permeabilidade da membrana (Bogatek et al. 2005). Kato-Noguchi e Macías (2005) registraram esse efeito através do composto MBOA (6-methoxy-2-benzoxazolinone), na qual este inibiu a germinação de alface por impedir a indução da síntese de  $\alpha$ -amilase, que mobiliza as reservas armazenadas e mantém a atividade respiratória das sementes.

Os extratos aquosos de folha e caule de *S. lethalis*, a partir da concentração 2,5%, reduziram em mais de 50% o crescimento radicular das plântulas de rabanete, gergelim e trigo. O presente trabalho verificou que as plântulas são mais sensíveis aos extratos vegetais do que os diásporos, e a raiz é a parte mais afetada da plântula, corroborando com outros trabalhos (Souza et al., 2010; Teerarak et al., 2012; Grisi et al., 2013; Reigosa et al., 2013, Anese et al., 2014). As inibições promovidas sobre o desenvolvimento da raiz são um dos principais fatores que indicam sensibilidade da planta aos aleloquímicos (Souza Filho e Duarte, 2007), principalmente durante o desenvolvimento inicial da plântula, que é caracterizado por alto metabolismo e sensibilidade ao estresse ambiental (Cruz-Ortega et al., 1998). A hiperalometria (comprimento da parte aérea > comprimento da raiz) é uma característica comum observada nos estudos de fitotoxicidade dos extratos vegetais, em que a raiz é o órgão mais afetado e com menor tamanho. Esse fato também foi registrado para as eudicotiledôneas estudadas (gergelim e rabanete), porém, para a monocotiledônea (trigo) o comprimento da parte aérea foi menor que o comprimento da raiz (hipoalometria).

O efeito visível dos aleloquímicos sobre a germinação e o crescimento é somente uma sinalização secundária do que ocorreu inicialmente em nível molecular e celular (Ferreira e Áquila, 2000; Magiero et al., 2009). Dessa maneira, a redução no crescimento radicular das plântulas submetidas ao estresse dos extratos fitotóxicos pode estar associada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema, fato observado no presente estudo com as plântulas de gergelim. Cruz-Ortega et al. (1998) também observaram que os extratos aquosos de *Sicyos deppei* G. Don condicionaram desorganização dos tecidos e falta de diferenciação celular nas raízes de feijão, evidenciados por alterações ultra-estruturais na membrana plasmática, parede vegetal, mitocôndrias, retículo endoplasmático e na divisão celular. Isto indica a provável interferência dos aleloquímicos na concentração das diferentes categorias de hormônios, tais como auxina, etileno e citocininas (Gatti et al., 2010).

O crescimento celular é interrompido em situações de estresse, sendo a auxina o fitormônio responsável pela regulação do tamanho celular. As auxinas exercem uma importante função na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Kerbaui, 2012), modulando diversos processos, como as respostas trópicas a luz e gravidade, arquitetura geral de raízes e caules, desenvolvimento vascular, alongação celular, entre outros (Cleland, 2004; Aloni et al., 2006). As plântulas submetidas ao estresse fitotóxico sofrem alterações nas enzimas presentes na membrana plasmática, como a ATPase da bomba de próton que é responsável pela formação de um gradiente eletroquímico. Sua inibição resulta na ausência de força motriz para efetuar o transporte de íons e metabólitos pela membrana. Isso reflete na redução da absorção de água e sais minerais pela raiz e, conseqüentemente prejudica as funções essenciais da planta como a fotossíntese, respiração e síntese de proteínas, resultando na redução do crescimento (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Além disso, os aleloquímicos estão associados à inibição da mitose e/ou rompimento da estrutura das organelas, como o núcleo e a mitocôndria. Observações microscópicas têm ajudado na detecção de anomalias no arranjo mitótico ou formação de paredes celulares atípicas, podendo sugerir o rompimento dos microtúbulos ou alterações na biossíntese da parede celular (Zhang et al., 2010).

Os aleloquímicos estão presentes em quase todas as partes da planta, incluindo caules, folhas, flores, sementes, frutos e raízes (Singh et al., 2003; Tanveer et al., 2012). No entanto, diferenças são observadas entre as espécies em relação ao seu potencial alelopático e sua capacidade de produzir fitotoxinas em diferentes órgãos (Qasem e Foy, 2001; Veenapani, 2004). No presente trabalho, observou-se que as espécies de rabanete e gergelim foram mais afetadas pelo extrato foliar de *S. lethalis*, enquanto o trigo pelo extrato caulinar. Essas diferenças nas respostas fitotóxicas de compostos de diferentes órgãos de uma mesma planta também foram registradas com *A. humilis* (Periotto et al., 2004), *Sapindus saponaria* L. (Grisi et al., 2012) e *Drimys brasiliensis* Miers (Anese et al., 2014). No entanto, os maiores efeitos inibitórios relatados sobre as espécies alvo são decorrentes da atuação do extrato foliar (Ashrafi et al., 2009; Tanveer et al., 2010; Khan et al., 2011; Grisi et al., 2012). Segundo Dorning e Cipollini (2006), a folha parece ser a maior fonte de produtos químicos envolvidos na fitotoxicidade.

Serjanosídeos, saponinas e taninos são metabólitos secundários relatados em folha e caule de *S. lethalis* (Teixeira et al., 1984; Pereira, 2013) e, estes podem estar envolvidos com a atividade fitotóxica observada para a espécie. Entre os compostos mais abundantes encontrados em espécies da família Sapindaceae destacam-se as saponinas (Murgu e Rodrigues-Filho 2006; Tsuzuki et al., 2007). Essas substâncias possuem um amplo espectro de atividades biológicas (Pelegriani et al., 2008), e parecem desempenhar um importante papel na regulação do crescimento de plântulas (Ohara e Ohira, 2003). Assim, o extrato aquoso de *S. lethalis* pode fornecer uma vantagem competitiva para a espécie, já que suas fitotoxinas podem inibir a germinação e o crescimento de

outras plantas. Esses efeitos podem ter implicações ecológicas importantes, contribuindo para a dominância de *S. lethalis* e, conseqüentemente, na modificação da estrutura da comunidade do cerrado.

## 5. Conclusão

Os extratos de folha e caule de *S. lethalis* inibiram o processo de germinação e o crescimento das plântulas. O efeito fitotóxico dos extratos foi dependente da concentração e variou de acordo com a espécie receptora. O rabanete e o gergelim foram mais afetados pelo extrato foliar, e o trigo pelo extrato caulinar. Um dos modos de ação observado foi no crescimento radicular das plântulas de gergelim, em que os extratos ocasionaram uma diminuição significativa no alongamento das células do metaxilema.

## 6. Referências

AIRES, S.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botanica Brasílica**, v. 19, p. 339-344, 2005.

ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v. 97, p. 883-893, 2006.

ANESE, S.; GRISI, P.U.; JATOBA, L.J.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V.C.; GUALTIERI, S.C.J. Seasonal variation in phytotoxicity of *Drimys brasiliensis* Miers. **Idesia**, v. 32, n. 3, p. 109-116, 2014.

AQUINO, F.G.; PEREIRA, C.S.; PASSOS, F.B.; OLIVEIRA, M.C. Composição florística e estrutural de um cerrado sentido restrito na área de proteção de manancial Mestre d'Armas, Distrito Federal. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 565-575, 2014.

ASHRAFI, Z.Y.; SADEGHI S.; MASHHADI, H.R. Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of seedling quack grass (*Agropyrum repens*). **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 22, p. 37-43, 2009.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica II**. A Verdade Presente, São Paulo. 23 ed 1963a.

BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 2011.

BATALHA, M.A.; MANTOVANI, W. Floristic composition of the cerrado in the Pé-de-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, southeastern Brazil). **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, n. 3, p. 289-304, 2001.

BOGATEK, R.; ORACZ, K.; GNIAZDOWSKA, A. Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Fourth World Congress on Allelopathy, 2005. [http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409\\_bogatekr.htm](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409_bogatekr.htm). Acessado em 22/06/2010.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M.; VILLELA, F.A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikianianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasílica**, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012.

BRAGA FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J.; SOUZA, E.R.B.; MAZON, L.T.; SILVA, L.B. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Araticum* oriundos do cerrado de Goiás. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 74-81, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

CARVALHO, F.A.; RODRIGUES, V.H.P.; KILCA, R.V.; SIQUEIRA, A.S.; ARAÚJO, G.M.; SCHIAVINI, I. Composição florística, riqueza e diversidade de um cerrado sensu stricto no sudeste do estado de Goiás. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 64-72, 2008.

CLELAND, R.E. The final action of hormones. p. 204-220. In: P.J. DAVIES. **Plant hormones – Biosynthesis, signal transduction, action!** Boston, London, Kluwer Academic Publishers. 750p, 2004.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Cerrado**. 2010. Disponível em: <<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots/cerrado/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 15 de agosto de 2010.

CRUZ, G. L., **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, Editora Civilização Brasileira RJ, n. 2094, 1979.

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 2039-2057, 1998.

DORNELES, M.C.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Germinação de diásporos recém-colhidos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) ocorrente no cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p.399-408, 2005.

DORNELES, M.C.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschut, Fabaceae, estabelecida em fragmentos florestais do Cerrado, MG. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 3, p. 291-304, 2013.

DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.

FELFILI, J.M.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; SEVILHA, A.C.; FAGG, C.W.; WALTER, B. M.T.; NOGUEIRA, P.E.; REZENDE, A.V. Diversity, floristic and structural patterns of cerrado vegetation in Central Brazil. **Plant Ecology**, v. 175, p. 37-46, 2004.

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, D.F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopátia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FONSECA, M.S.; SILVA-JÚNIOR, M.C. Fitossociologia e similaridade florística entre trechos de Cerrado sentido restrito em interflúvio e em vale no Jardim Botânico de Brasília, DF. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 19-29, 2004.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; DE SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n.1, p. 61-68, 2002.

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

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.

GLEASON, F. K. 2012. **Plant Biochemistry**. 1st Edition. Jones & Bartlett Learning.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3B, p. 395-407, 2005.

GORIN, P.A.J.; TEIXEIRA, A.Z.A.; TRAVASSOS, L.R.; LABOURIAU, M.L.S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* tinguí. **Carbohydrate Research**, v.282, n.2, p.325-333, 1996.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Allelopathic interference of *Sapindus saponaria* root and mature leaf aqueous extracts on diaspore germination and seedling growth of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, p. 1-9, 2012.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C.; FORIM, M.R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, v. 31, p. 239-248, 2013.

GUSMAN, G.S.; YAMAGUSHI, M.Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de extratos aquosos de *Bidens pilosa* L., *Cyperus rotundus* L. e *Euphorbia heterophylla* L. **Iheringia, Sér. Bot.**, v. 66, p. 87 - 98, 2011.

HARBONE, J.B. 1993. **Introduction to Ecological Biochemistry**. London, Fourth Edition. Academic Press.

- IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S.C.J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 1, p. 54-61, 2013.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. Allelopathic effect of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on characteristics of four soils and tomato and mustard growth. **American Journal of Botany**, v. 81, p. 799-804, 1994.
- KATO-NOGUCHI, H.; MACIAS, F.A. Mode of action of MBOA on inhibition of plant germination. In: **Proceedings of Second European Allelopathy Symposium** "Allelopathy – from understanding to application". Puławy, Poland, 96-97 pp, 2004.
- KATO-NOGUCHI, H.; MACIAS, F.A. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and alpha-amylase activity in lettuce seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 12, p. 1304-1307, 2005.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2012.
- KHAN, M.; HUSSAIN, F.; MUSHARAF, S.; IMDADULLAH. Allelopathic effects of *Rhazya stricta* decne on seed germination and seedling growth of maize. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 30, p. 6391-6396, 2011.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, DC: OEA, 1983.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait). F. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48., p. 263-284, 1976.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Rima Artes e Textos, Sao Carlos, 2004.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.
- MA, L.; WU, H.; BAI, R.; ZHOU, L.; YUAN, X.; HOU, D. Phytotoxic effects of *Stellera chamaejasme* L. root extract. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 5, p. 1170-1176, 2011.
- MAGIERO, E.C.; ASSMANN, J.M.; MARCHESE, J.A.; CAPELIN, D.; PALADINI M.V.; TREZZI, M.M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.
- MAGUIRE, J.D. Speed germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

- MAHMOUD, I.; MOHARRAN, F.A.; MARZOUK, M.S.; SOLIMAN, H.S.; EL-DIB, R.A. Two new flavonol glycosides from leaves of *Koelreuteria paniculata*. **Pharmazie**, v.56, n.7, p.580-582, 2001.
- MENDES-RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, P.E.; RANAL, M.A. Seed germination and seedling growth of two *Pseudobombax* species (Malvaceae) with contrasting habitats from Brazilian Cerrado. **Revista de Biología Tropical**, v. 59, n. 4, p. 1915-1925, 2011.
- MURGU, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of Glycosides from *Sapindus saponaria* using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p.1281-1290, 2006.
- NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.
- NARWAL, S.S.; SAMPIETRO, D.A. Allelopathy and allelochemicals. In: SAMPIETRO, D.A.; CATALAN, C.A.N.; VATTUONE, M.A. (Eds.). **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals / Natural Products**. USA, Science Publishers, 2009. p. 3-5.
- OHARA, S.; OHIRA, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. **Journal of Wood Sciences**, v. 49, p. 59-64, 2003.
- OLIVEIRA, J.P.R. **Tamanho ótimo de amostra para análise da qualidade fisiológica de diásporos de espécies florestais nativas do cerrado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011, 156 p.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G. E BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, p. 401-406, 2004.
- ORTEGA, A.; GARCIA, P.E.; CÁRDENAS, J.; MANCERA, C.; MARQUINA, S.; GARDUÑO, M.L.C.; MALDONADO, E. Methyl dodonates, a new type of diterpenes with a modified clerodane skeleton from *Dodonaea viscosa*. **Tetrahedron**, v.57, n.15, p.2981-2989, 2001.
- PELEGRINI, D.D.; TSUZUKI, J.K.; AMADO, C.A.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.
- PEREIRA, V.C. **Potencial fitotóxico de *Serjania lethalis* A. St-Hil.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013, 157p.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, n. 3, p. 425-430, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.
- QASEM, J.R.; AND C.L. FOY. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects. **Journal of Crop Production**, v. 4, p.43-119, 2001.

- RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.
- REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.
- RIBEIRO, J.F.; SILVA, J.C.S.; BATMANIAN, G.J. Fitossociologia de tipos fisionômicos de cerrado em Planaltina, DF. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 8, p.131-142, 1985.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Ed.). Cerrado: Ecologia e Flora. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 151-212.
- RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.V.; SILVA, R.M.G. Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 2006.
- SASSAKI, R.M.; ZAIDAN, L.B.P.; FELIPPE, G.M.; CESARINO, F. Efeito de fotoperíodo, tipo de solo e época do ano no crescimento inicial da espécie arbórea do cerrado, *Dalbergia miscolobium*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, p. 193-201, 1996.
- SILVA, R.N.; DUARTE, G.L.; LOPES, N.F.; MORAES, D.M.; PEREIRA, A.L.A. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 215-220, 2008.
- SILVESTRE, D.M.; KOLB, R.M.; FREI, F.; SANTOS, C. Phytotoxicity of organic extracts of *Turnera ulmifolia* L. and *Turnera diffusa* Willd.ex Schult. in cucumber seeds. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 476-482, 2013.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 22, p. 239-311, 2003.
- SINGH, A.; SINGH, D.; SINGH, N.B. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation**, v. 58, p. 163-171, 2009.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; DUARTE, M.L.R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, p. 227-230, 2007.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

SOUZA, F.M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S.C.J.G.A.; RODRIGUES, R.R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 1, p. 169-174, 2010.

TAIZ, L; ZEIGER, E. 2010. **Plant Physiology**. Sunderland, Sinauer Assoc. Inc. Publ.

TANVEER, A.; JABBAR, M.K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R.N.; JAVAID, M.M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

TANVEER, A.; REHMAN, A.; JAVAID, M.M.; ABBAS, R.N.; SIBTAIN, M.; AHMAD, A.U.H.; IBIN-I-ZAMIR, M.S.; CHAUDHARY, K.M.; AZIZ, A. Allelopathic potential of *Euphorbia helioscopia* L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, p. 75-81, 2010.

TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 1277-1285, 2012.

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.; SVIDZINSKI, 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 and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.

VEENAPANI, D. Inhibition in seed germination of *Oryza sativa* (paddy) by two weed species. **Flora and Fauna**, v. 10, p. 11-12, 2004.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

VOUTQUENNE, L.; KOKOUGAN, C.; LAVAUD, C.; POUNY, I.; LITAUDON, M. Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austro-caledonica*. **Phytochemistry**, v.59, n.8, p. 825-832, 2002.

WALSH, D.; SANDERSON, D.; HALL, L.M.; MUGO, S.; HILLS, M.J. Allelopathic effects of camelina (*Camelina sativa*) and canola (*Brassica napus*) on wild oat, flax and radish. **Allelopathy Journal**, v. 33, n. 1, p.83, 2014.

WARDLE, D.A.; NICHOLSON, K.S.; AHMED, M. Comparison of osmotic and allelopathic effects of grass leaf extract on grass seed germination and radicle elongation. **Plant Soil**, v. 140, p. 315-319, 1992.

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.

ZHANG, Y.; GU, M.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. **Plant Soil**, v. 327, p.455-463, 2010.

## **CAPÍTULO II**

### **Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas**

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis* A. St.-Hil. sobre a germinação dos diásporos e crescimento de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.). O extrato bruto etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol. A partir deste, os extratos foram solubilizados em solução tampão e dimetil sulfóxido (DMSO) nas concentrações 10,0; 7,5; 5,0 e 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Nos bioensaios comparou-se o efeito desses extratos com o herbicida oxifluorfem. Os extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* exerceram atividade inibitória no processo de germinação e no crescimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo, com efeito dependente da concentração. Verificou-se que a redução do crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que para algumas variáveis o efeito inibitório foi similar e até mesmo superior ao do herbicida comercial. Desta maneira, pode-se dizer que os extratos de *S. lethalis* podem ser uma alternativa promissora para o manejo sustentável do amendoim-bravo e capim-arroz.

**Palavras-chave:** alelopatia, cipó-timbó, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*.

**ABSTRACT** – (Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control). The objective of this study was to evaluate the effect of ethanolic extract of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. leaves and stems on diaspores germination and seedlings growth of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.). The crude ethanolic extract was prepared in a proportion of 100 g dry plant material dissolved in 500 ml of ethanol. From this, the extracts were solubilized in a buffer solution and dimethyl sulfoxide (DMSO) to concentrations 10.0, 7.5, 5.0 and 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. The bioassays compared the effect of these extracts with herbicide oxyfluorfen. The ethanolic extracts of *S. lethalis* leaves and stems caused inhibitory activity in germination process and seedlings growth of barnyardgrass and wild poinsettia, with concentration-dependent effect. The reduction in seedling root length of *E. heterophylla* may be attributed to the reduced in cells elongation of metaxylem. Phytotoxicity of the extracts ranged according to the receptor species, and for some variables the inhibitory effect was similar and even superior to commercial herbicide. Thus, *S. lethalis* extracts may be a promising alternative for the sustainable weed management.

**Keywords:** allelopathy, cipó-timbó, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*.

## 1. Introdução

As plantas daninhas podem ser controladas através de uma combinação de práticas de cultivo, tais como rotação de culturas, sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, controle mecânico e adubação verde (Mortensen et al., 2000; Kato-Noguchi, 2003). O uso de herbicidas sintéticos é o principal método de controle das plantas daninhas devido à sua alta eficiência e praticidade. No entanto, a intensa aplicação desses agrotóxicos causa sérios impactos ambientais e a evolução de populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas (Pinto et al., 2008; Hagemann et al., 2010). Estudos recentes têm focado na aplicação do processo alelopático na agricultura, com o objetivo de utilizar os aleloquímicos como herbicidas, desenvolvendo, assim, práticas mais sustentáveis (Chon et al., 2003).

As interações alelopáticas são mediadas através de metabólitos secundários liberados, por plantas doadoras, para o ambiente e que influenciam o crescimento e desenvolvimento dos ecossistemas naturais e agrícolas (Inderjit e Duke, 2003). Os aleloquímicos pertencem a diversos grupos químicos e apresentam diferentes modos e locais de ação bioquímica (Reigosa et al., 1999). Substâncias alelopáticas podem ser liberadas por uma variedade de processos (Bonanomi et al., 2006) e essas estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, caules e sementes (Gatti et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2013). Entretanto, a distribuição das substâncias não é uniforme, havendo variações em função da espécie e do órgão da planta analisado (Hedge e Miller, 1990; Friedman, 1995; Souza Filho, 2006). Efeitos alelopáticos inibitórios típicos resultam da ação de grupos aleloquímicos que coletivamente interferem em vários processos fisiológicos, alterando os padrões de crescimento das plantas (Gatti et al., 2010). A ação destes metabólitos pode afetar a respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura estomática, os níveis hormonais, divisão e alongação celular, e a estrutura e permeabilidade das membranas e paredes celulares (Reigosa et al., 1999; Gatti et al., 2010).

Estudos alelopáticos com espécies características do cerrado são uma alternativa para preservação desse ecossistema (Oliveira et al., 2004); porém, o número de espécies analisadas ainda é muito pequeno. O cerrado sofre com a ação do fogo, apresenta baixa disponibilidade de nutrientes e está exposto ao déficit hídrico sazonal. Essas características agravam a competição no que diz respeito ao estabelecimento das espécies vegetais e fazem desta fitofisionomia uma importante fonte de estudos do ponto de vista alelopático (Oliveira et al., 2004).

*Serjania lethalis* A. St.-Hil., conhecida popularmente como cipó-timbó, é uma espécie com o hábito de liana, sendo frequentemente encontrada no cerrado (Fernandes e Negreiros, 2001). A família Sapindaceae, a qual espécie *S. lethalis* pertence, é uma fonte rica de isoprenóides, polifenóis, saponinas, triterpenos e diterpenos (Murgu e Rodrigues-Filho 2006). A composição

fitoquímica de suas folhas e caules é bem conhecida e inclui importantes propriedades farmacológicas (Napolitano et al., 2005; Lima et al., 2006); porém, poucos estudos examinaram o potencial alelopático da espécie e seu efeito fitotóxico sobre as plantas daninhas.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar e quantificar o efeito fitotóxico do extrato etanólico de folhas e caules de *S. lethalis* sobre a germinação dos diásporos e crescimento de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Preparação dos extratos

Folhas e caules de *S. lethalis* foram coletados de indivíduos ocorrentes na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no município de São Carlos-SP (21° 58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), em maio de 2011. Um exemplar da espécie foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com o voucher HUFSCar 8340. A região é caracterizada pelo tipo climático Aw, segundo o sistema de classificação de Köppen (1948), considerado tropical úmido com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (Ribeiro e Walter, 2008).

Após a coleta, as folhas e os caules foram secos em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, durante 72 h, e trituradas em moinho industrial. Posteriormente, o material foi pesado, embalado a vácuo em sacos plásticos e armazenado sob temperatura ambiente (25 °C), até a realização dos experimentos.

O extrato etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol. O material vegetal foi submetido à extração etanólica, no escuro e na temperatura ambiente, durante 72 h. Após esse período, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato bruto etanólico. A partir deste, os extratos foram solubilizados em solução tampão (10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH, pH = 6) e DMSO (dimetil sulfóxido, 5 µL mL<sup>-1</sup>) nas concentrações 10,0; 7,5; 5,0 e 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Nos testes de germinação e crescimento de plântulas utilizou-se como controle negativo a solução tampão e DMSO (5 µL mL<sup>-1</sup>) e, controle positivo o herbicida comercial oxifluorfem (240 g.i.a. L<sup>-1</sup>) nas doses 1,0 e 2,0 L ha<sup>-1</sup>.

## 2.2. Bioensaio de germinação

As quatro concentrações obtidas a partir do extrato bruto etanólico das folhas e caules de *S. lethalis* foram aplicadas nos diásporos de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-arroz (*E. crus-galli*).

O bioensaio foi conduzido em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL dos extratos, herbicida ou solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 30 diásporos. O experimento foi instalado em estufa B.O.D. a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h (Inoue et al., 2010). As leituras foram realizadas a cada 12 h, durante os sete primeiros dias, e em intervalos de 24 h, até a estabilização da germinação, adotando-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação. Foram avaliadas a germinabilidade ( $G$ ), a velocidade de germinação de Maguire ( $VG$ ), o tempo ( $\bar{t}$ ) e a velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ) (Ranal e Santana, 2006).

O termo diásporo foi utilizado ao longo do texto para designar ambos os tipos de unidades de dispersão estudadas. Quando o capim-arroz foi referido, utilizou-se o nome específico de seu diásporo, no caso, uma cariopse. O termo semente foi utilizado para a unidade de dispersão do amendoim-bravo.

## 2.3. Bioensaio de crescimento de plântulas

Na análise de crescimento de plântulas de amendoim-bravo e capim-arroz, as unidades de dispersão foram previamente germinadas em água destilada. Plântulas com 3 mm de raiz primária foram transferidas para caixas de plástico transparente (13 x 8 x 3 cm), contendo como substrato duas folhas de papel de filtro umedecido com 5 mL de solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), extratos etanólicos de folhas e caules ou herbicida, nas mesmas concentrações adotadas para o teste de germinação.

As caixas foram tampadas e mantidas em B.O.D. a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Utilizaram-se quatro repetições de 10 plântulas, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após sete dias do transplante, foram avaliados os comprimentos da parte aérea (do colo até o meristema caulinar) e raiz primária (do colo até o meristema radicular) das plântulas.

#### **2.4. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema)**

Plântulas de amendoim-bravo cresceram em soluções do controle negativo e dos extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis*, nas mesmas condições citadas para o bioensaio de crescimento. Decorrido quatro dias, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, o segmento da raiz primária foi removido e imerso em álcool 70% (Gatti et al., 2010).

A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997), em que as raízes ficaram imersas em álcool (70%), durante cinco dias, e depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25%) a 60 °C, durante 48 h, período em que foi observado a clarificação do material.

Em seguida, o material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina ( $C_{20}H_{19}N_4C_1$ ) e soda cáustica (NaOH a 10%), e transferido para estufa, a 60 °C, por 24 h. Após a coloração, a raiz foi fixada em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Utilizaram-se quatro repetições de raízes primárias crescidas em diferentes concentrações dos extratos e no controle. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, da região central em direção ao colo (Gatti et al., 2010), no aumento de 20 vezes. A partir dessas fotos, foram medidas até 15 células centrais do metaxilema, utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0.

#### **2.5. Análise estatística**

Os dados obtidos para cada uma das características avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando essas duas pressuposições foram atendidas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Procedeu-se à regressão linear ou quadrática, quando o resultado da ANOVA foi significativo. A qualidade do ajuste dos modelos foi aferida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). As variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos foram representadas nas figuras com os valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Foi realizada a análise conjunta dos dados analisados, referentes aos extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* e ao herbicida; uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes 1990). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2003) e SPSS 16.0.

### 3. Resultados e Discussão

Os extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* inibiram significativamente o processo de germinação das cariopses de capim-arroz. Para essas unidades de dispersão semeadas com extrato de folhas, observou-se decréscimo linear na germinabilidade e na velocidade de germinação de Maguire (1,08% e 0,0127 cariopses h<sup>-1</sup> para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato adicionado); enquanto, o tempo e a velocidade média de germinação atingiram seus valores máximo (72,32 h) e mínimo (0,0137 h<sup>-1</sup>) nas concentrações estimadas de 6,79 e 3,69 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O extrato do caule promoveu aumento linear no tempo médio de germinação (1,47 h para cada adição de 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato) e, como conseqüência, houve decréscimo linear na velocidade média e na velocidade de germinação de Maguire (0,0002 h<sup>-1</sup> e 0,0091 cariopses h<sup>-1</sup> para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato adicionado). A germinabilidade do capim-arroz foi mínima (59%) na concentração 10 mg mL<sup>-1</sup> de extrato do caule (Figura 1).

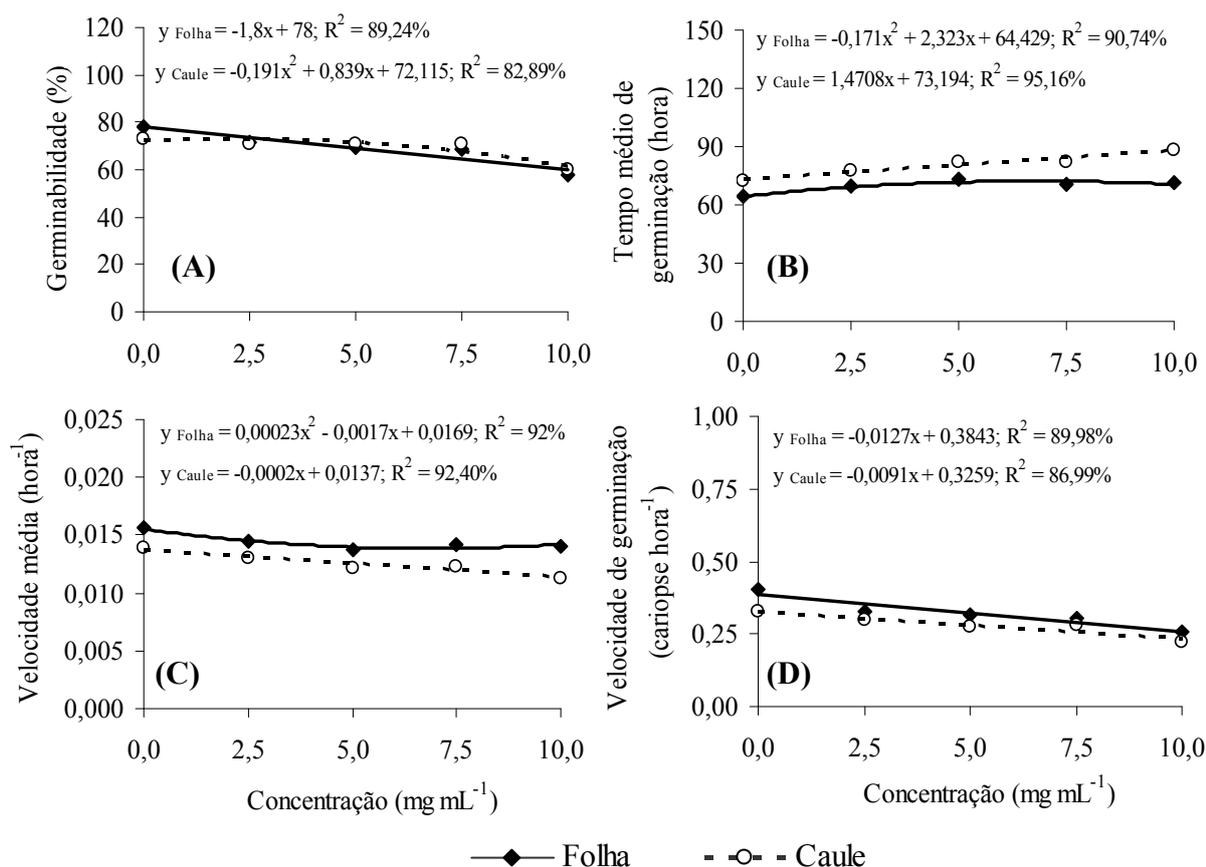


Figura 1. Germinabilidade (A), tempo médio (B), velocidade média (C) e velocidade de germinação de Maguire (D) das cariopses de capim-arroz submetidos à ação do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

As plântulas de capim-arroz crescidas nos extratos de folhas apresentaram menores comprimentos da parte aérea (21,47 mm) e da raiz (4,05 mm) nas concentrações 9,44 e 7,29 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os extratos do caule não exerceram efeito significativo sobre o desenvolvimento da parte aérea dessas plântulas; porém, a raiz apresentou menor comprimento (4,90 mm) na concentração estimada de 6,98 mg mL<sup>-1</sup> (Figura 2). Para ambos os extratos, o maior efeito inibitório registrado sobre o sistema radicular do capim-arroz ocorreu em concentrações inferiores a 7,5 mg mL<sup>-1</sup>. Trabalhos conduzidos por Grisi et al. (2012) verificaram que extratos aquosos de folhas e frutos de *Sapindus saponaria* L. também inibiram a germinação e o desenvolvimento de *E. crus-galli*, evidenciando a fitotoxicidade dessa outra espécie de Sapindaceae no controle do capim-arroz.

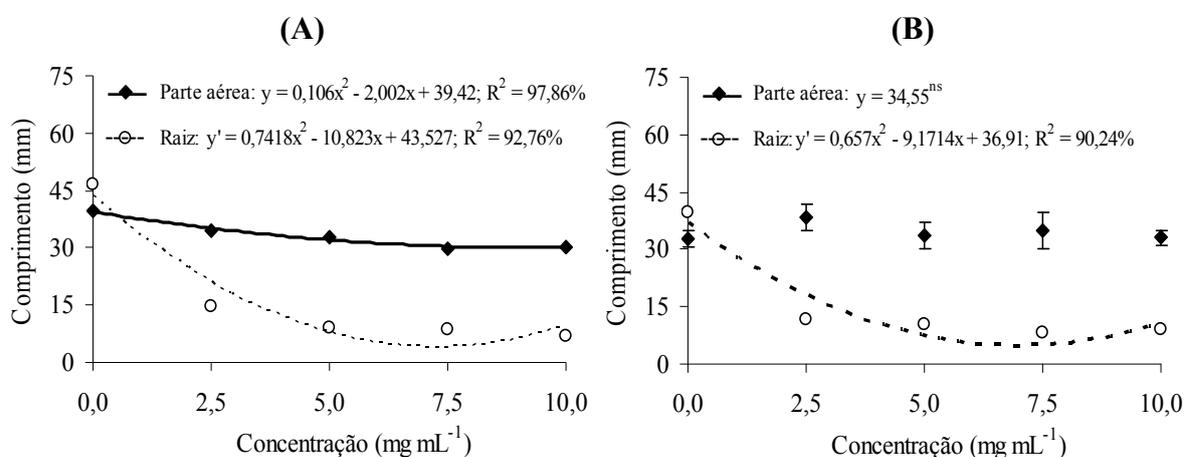


Figura 2. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz submetidos à ação do extrato etanólico de folhas (A) e caules (B) de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Os extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* exerceram efeito fitotóxico no processo de germinação das sementes de amendoim-bravo. O extrato do caule reduziu linearmente a germinabilidade, a velocidade média e a velocidade de germinação de Maguire (1,83%; 0,0008 h<sup>-1</sup> e 0,0277 sementes h<sup>-1</sup> para cada adição de 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato); e, em contrapartida, verificou-se aumento linear no tempo médio de germinação (3,4768 h para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato) dessas sementes. Para o extrato das folhas, observaram-se valores mínimos na germinabilidade (6,75%), na velocidade média (0,0187 h<sup>-1</sup>) e na velocidade de germinação de Maguire (0,2543 sementes h<sup>-1</sup>), nas concentrações estimadas de 6,75; 10,0 e 7,61 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Na concentração 7,70 mg mL<sup>-1</sup> de extrato de folha, registrou-se o maior tempo médio de germinação (55,56 h) das sementes de amendoim-bravo (Figura 3).

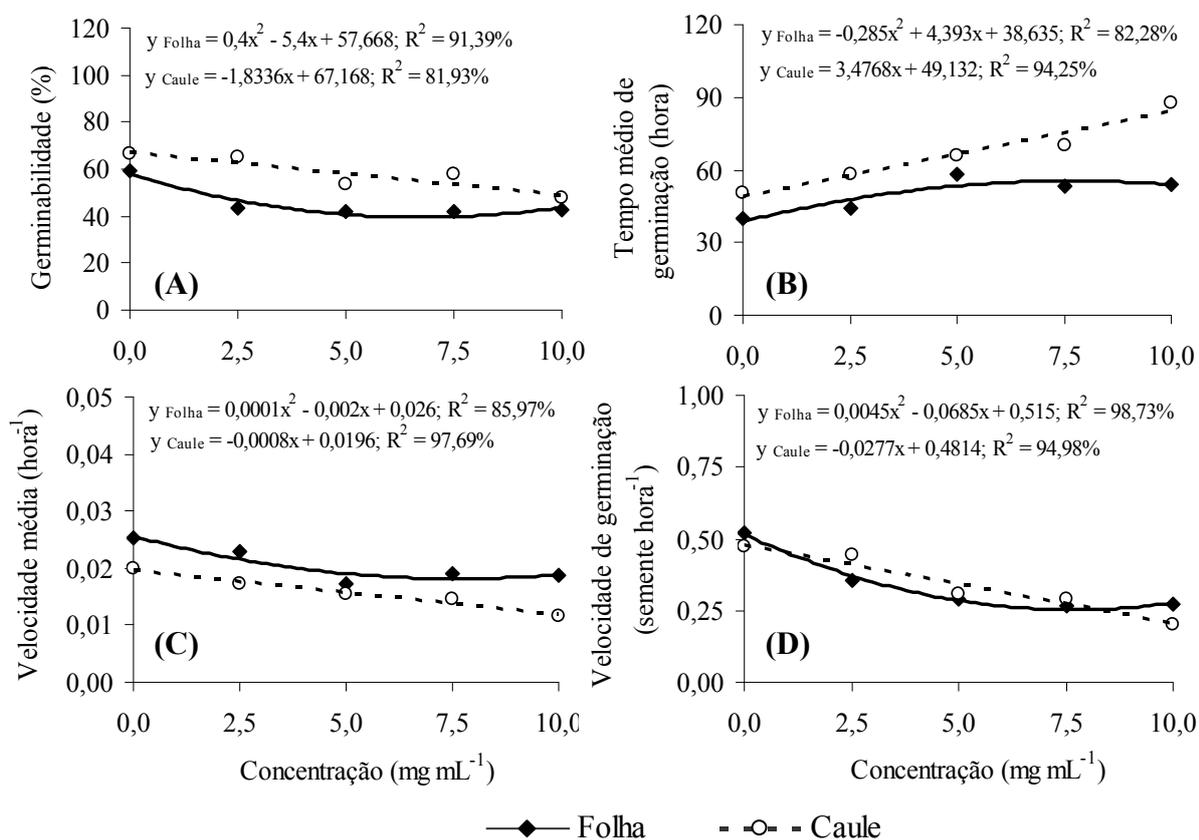


Figura 3. Germinabilidade (A), tempo médio (B), velocidade média (C) e velocidade de germinação de Maguire (D) de sementes de amendoim-bravo submetidos à ação do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Para todos os parâmetros avaliados no bioensaio de crescimento, os extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* exerceram efeito inibitório no desenvolvimento das plântulas de amendoim-bravo. O comprimento da parte aérea (19,98 mm) e da raiz (8,91 mm) foi mínimo nas concentrações 7,24 e 7,15 mg mL<sup>-1</sup> de extrato de folha, respectivamente. As plântulas crescidas nos extratos do caule apresentaram menores valores no comprimento da parte aérea e da raiz nas concentrações estimadas de 7,98 e 8,67 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4).

Kern et al. (2009) afirmaram que as sementes de amendoim-bravo apresentam grande resistência a diversos aleloquímicos conhecidos, tais como rutina, quercitina, ácido aconítico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico e eucaliptol. O amendoim-bravo é uma espécie agressiva e de difícil controle, mesmo na presença de soluções de fitotoxicidade conhecida; por isso, a necessidade de mais estudos em busca de alternativas para o manejo dessa planta daninha.

O bioensaio de germinação é importante e necessário para a determinação das respostas das substâncias em estudo. No entanto, a utilização de diversas variáveis que possam detectar as mais sutis variações nos padrões germinativos é de extrema importância, uma vez que apenas a porcentagem de germinação não é capaz de englobar os fatores físicos e temporais envolvidos nesse processo (Ferreira e Áquila, 2000). O tempo médio de germinação é um fator importante na

sobrevivência das espécies daninhas, uma vez que plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido, menor competição por recursos e menor chance de se estabelecer no ambiente (Souza et al., 2010).

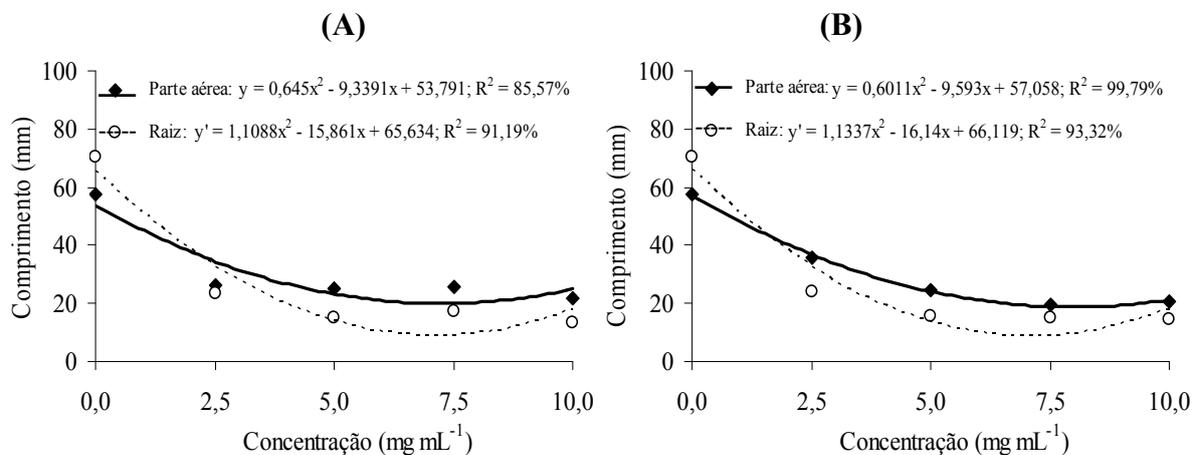


Figura 4. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidos à ação do extrato etanólico de folhas (A) e caules (B) de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Importância similar deve ser dada à morfologia das plântulas submetidas a meios que induzam o estresse, como a presença de substâncias alelopáticas, considerando que a alteração do padrão germinativo pode ser menos drástica que a ação direta desses compostos nos tecidos jovens das plântulas (Ferreira e Áquila, 2000). A plântula é a fase de maior suscetibilidade ao controle, em virtude de que nela se determina os potenciais produtivos dos indivíduos, bem como a ocorrência do seu estabelecimento no habitat (Ferreira e Áquila, 2000). Os danos na parte aérea e raiz poderiam, provavelmente, atrasar ou mesmo impedir o desenvolvimento das plântulas, que por sua vez aumentaria a sua vulnerabilidade e capacidade competitiva, diminuindo as chances de uma plântula sobreviver, crescer e atingir a maturidade (Souza et al., 2010). Desta forma, o controle das plantas daninhas é recomendado, principalmente, nas suas fases iniciais de desenvolvimento.

Comparando o efeito dos diferentes órgãos de *S. lethalis* com o herbicida oxifluorfem, verificou-se que a germinabilidade das sementes de amendoim-bravo foi mais afetada pelo extrato das folhas; no entanto, o herbicida seguido do extrato do caule ocasionou maior atraso na germinação dessas sementes. Para o capim-arroz, os extratos de *S. lethalis* e o herbicida exerceram o mesmo efeito na germinabilidade, porém as cariopses tratadas com herbicida apresentaram maior valor de  $\bar{x}$ , com menor  $\bar{v}$  e  $VG$  (Tabela 1). O desenvolvimento das plântulas daninhas estudadas foi similar entre os extratos. Para ambas as espécies, o alongamento da parte aérea foi mais afetado pelo herbicida; no entanto, os extratos de folhas e caules apresentaram inibição superior ao do

herbicida para o comprimento radicular. Assim, pode-se dizer que o herbicida atuou com mais intensidade na parte aérea; enquanto, os extratos investiram na inibição radicular das plântulas (Tabela 1). Isso pode ser explicado pelo fato de que o herbicida oxyfluorfen, pertencente à classe dos difenil-éters, inibi nas plantas a protoporfirinogênio oxidase (PROTOX ou PPO), enzima atuante na rota de síntese da clorofila e de citocromos (Hess, 2000). Com isso, este grupo precisa de luz para ser ativo, o que sugere que a sua fitotoxicidade está relacionada com o processo da fotossíntese (Novaes et al., 2013).

Tabela 1. Germinação e crescimento de plântulas de amendoim-bravo e capim-arroz submetidas à ação do herbicida e do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis*.

Variáveis (unidades)	Amendoim-bravo			Capim-arroz		
	Folha	Caule	Herbicida	Folha	Caule	Herbicida
<i>G</i> (%)	45,67 b	58,00 a	54,17 a	69,00 a	69,17 a	68,29 a
$\bar{t}$ (hora)	49,89 a	66,52 b	94,17 c	69,61 a	80,55 b	95,89 c
$\bar{v}$ : (hora <sup>-1</sup> )	0,0202 a	0,0157 b	0,0108 c	0,0144 a	0,0125 a	0,0089 b
<i>VG</i> (semente hora <sup>-1</sup> )	0,3403 a	0,3429 a	0,3763 a	0,3210 a	0,2802 a	0,1969 b
<i>CPA</i> (mm)	31,29 a	31,60 a	26,67 b	33,39 a	34,55 a	16,35 b
<i>CR</i> (mm)	27,91 b	27,90 b	39,83 a	17,24 b	15,70 b	24,22 a
<i>CCM</i> (μm)	203,49 a	190,33 a	-	-	-	-

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey a 0,05 de probabilidade. *G*: germinabilidade;  $\bar{t}$ : tempo médio de germinação;  $\bar{v}$ : velocidade média de germinação; *VG*: velocidade de germinação de Maguire; *CPA*: comprimento da parte aérea; *CR*: comprimento da raiz; *CCM*: comprimento das células do metaxilema.

Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos, em que os extratos de plantas alelopáticas geralmente têm efeito mais pronunciado sobre o crescimento da raiz do que na parte aérea (Inoue et al., 2010; Grisi et al., 2012). Isso pode ser atribuído pelo fato de que o crescimento radicular é caracterizado por altas taxas metabólicas, e por esta razão as raízes são altamente susceptíveis ao estresse ambiental, como os aleloquímicos no substrato (Cruz-Ortega et al., 1998). Em nível celular, o aleloquímico induz a peroxidação lipídica, afeta as atividades enzimáticas e rapidamente despolariza a membrana celular da raiz, causando um aumento generalizado na permeabilidade da membrana e bloqueando, assim, a absorção dos nutrientes (Santos et al., 2008). Considerando que o sistema radicular é a grande ligação das plantas com o meio físico, sendo o caminho para a entrada de água e nutrientes minerais, a má formação das raízes impede que esses fatores sejam ofertados em quantidade e qualidade adequados para a boa manutenção do estado fisiológico das plantas. De acordo com Souza Filho e Alves (2000), o efeito dos extratos no

desenvolvimento das raízes contribui para que as plantas daninhas tenham restrições no seu potencial competitivo, favorecendo as espécies cultivadas.

O estudo anatômico das raízes de plântulas de amendoim-bravo possibilitou uma melhor visualização dos efeitos fitotóxicos dos diferentes extratos, em nível celular. O grupo controle apresentou distribuição homogênea no tamanho celular, com predomínio para as células pertencentes aos tamanhos entre 395-580  $\mu\text{m}$  (51,7%), não encontrando células menores que 245  $\mu\text{m}$ . As plântulas que cresceram sob influência dos extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* apresentaram células distribuídas em diferentes classes de tamanhos, sendo que com o aumento da concentração dos extratos essa distribuição se tornou mais homogênea. As células do metaxilema das raízes de plântulas crescidas na presença dos extratos de folhas, nas concentrações 2,5; 5,0 e 7,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , apresentaram predominância na classe de tamanho entre 145-195  $\mu\text{m}$ , enquanto que na concentração 10  $\text{mg mL}^{-1}$ , 58,3% das células apresentaram tamanhos inferiores a 95  $\mu\text{m}$ . Para todas as concentrações do extrato do caule, as células do metaxilema das raízes de amendoim-bravo apresentaram predomínio nos tamanhos entre 95-145  $\mu\text{m}$  (Figura 5 e 7).

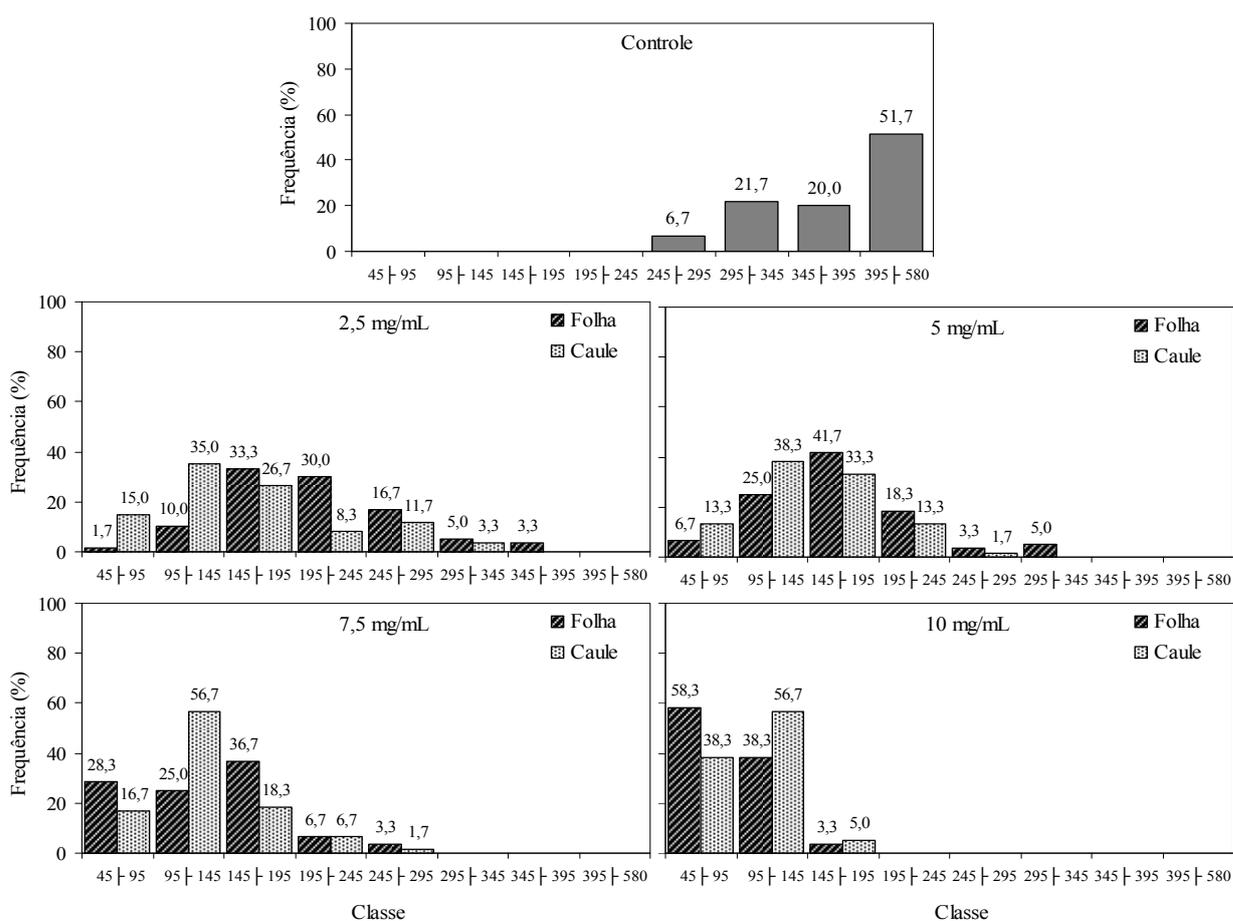


Figura 5. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

Não houve diferença significativa entre os extratos de folhas e caules de *S. lethalis* para o comprimento das células do metaxilema das raízes de amendoim-bravo (Tabela 1), no entanto, esse efeito foi dependente da concentração. O menor comprimento dessas células foi registrado nas concentrações estimadas de 8,85 e 7,55 mg mL<sup>-1</sup> de extrato de folha (95,18 μm) e caule (95,34 μm), respectivamente (Figura 6).

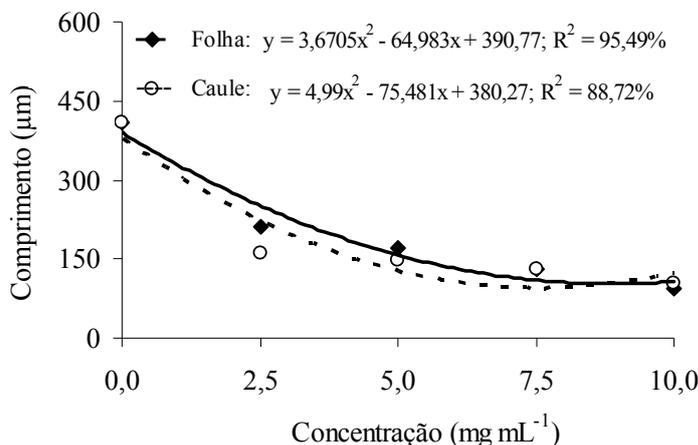


Figura 6. Comprimento (μm) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do extrato etanólico de folhas e caules de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações.

A redução no crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação dos extratos de *S. lethalis* pode estar associada com a inibição no alongamento celular do metaxilema. Isso indica a provável interferência dos aleloquímicos nas concentrações das diferentes categorias de hormônios. As citocininas e as auxinas são importantes no desenvolvimento radicular, na diferenciação vascular e no gravitropismo das plantas e, alguns trabalhos sugerem ainda que estes dois hormônios, em conjunto com o etileno regulam também a iniciação das raízes laterais (Aloni et al., 2006). Segundo Al-Wakeel et al. (2007), a inibição na elongação celular pode estar relacionada com a ação direta dos aleloquímicos e, por estes interferirem no processo de divisão celular e no equilíbrio entre os diferentes hormônios.

O efeito dos extratos hidroalcoólicos de folhas e caules de *Annona crassiflora* Mart. foi similar para germinabilidade e velocidade de germinação das sementes de amendoim-bravo; porém, extratos do caule foram mais eficientes em reduzir o hipocótilo e a radícula das plântulas do que o extrato foliar (Inoue et al., 2010). Esse efeito também foi observado por Li e Jin (2010), em que o extrato do caule de *Mikania micrantha* Kunth apresentou atividade inibitória superior ao extrato das folhas. Entretanto, a folha parece ser a maior fonte de produtos químicos envolvidos na fitotoxicidade (Dorning e Cipollini 2006); por isso, os maiores efeitos inibitórios registrados sobre

as espécies alvo são decorrentes de sua atuação (Ashrafi et al., 2009; Souza et al., 2010; Khan et al., 2011).

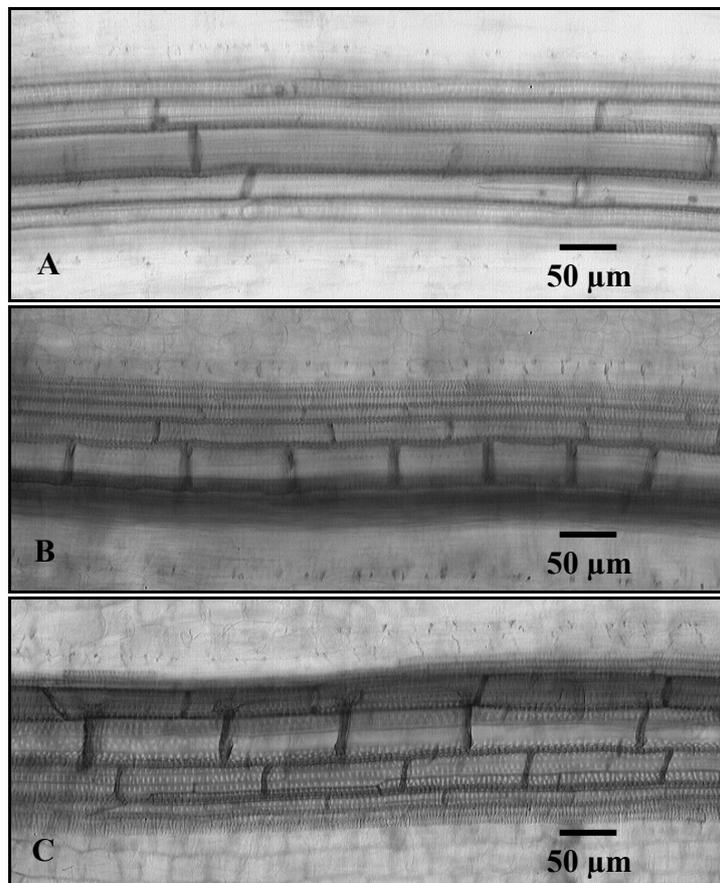


Figura 7. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do controle (A) e do extrato etanólico de folhas (B) e caules (C) de *Serjania lethalis*, na concentração 10mg/mL.

Dessa maneira, pode-se dizer que fitotoxicidade depende dos níveis de concentração dos extratos e também do órgão da planta analisado (Souza Filho, 2006; Li e Jin, 2010). As folhas, caules e raízes podem liberar quantidades diferentes de aleloquímicos para o ambiente (Souza Filho, 2006). No entanto, observamos no presente estudo que as diferentes partes da planta de *S. lethalis* (folha e caule), embora com funções fisiológicas distintas, não apresentaram diferenças significativas nos resultados dos testes de crescimento, anatomia e para algumas variáveis do bioensaio de germinação.

#### 4. Conclusão

Os extratos etanólicos de folhas e caules de *S. lethalis* exerceram atividade inibitória no processo de germinação e no crescimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo, com efeito dependente da concentração. Verificou-se que a redução no crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo está, em parte, relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que para algumas variáveis o efeito inibitório foi similar e até mesmo superior ao do herbicida comercial. Desta maneira, os extratos de *S. lethalis* brutos ou purificados, podem ser uma alternativa promissora para o manejo sustentável dessas espécies daninhas. No entanto, estudos posteriores deverão ser desenvolvidos buscando-se isolar e identificar os compostos responsáveis pela atividade fitotóxica.

#### 5. Referências

- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v. 97, p. 883-893, 2006.
- 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, p. 411-422, 2007.
- ASHRAFI, Z.Y.; SADEGHI S.; MASHHADI, H. R. Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of seedling quack grass (*Agropyrum repens*). **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 22, p. 37-43, 2009.
- BONANOMI, G.; SICUREZZA, M.G.; CAPORASO, S.; ESPOSITO, A.; MAZZOLENI, S. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. **New Phytologist**, v.169, p.571-578, 2006.
- CHON, S. U.; KIM, Y.M.; LEE, J.C. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Research**, v. 43, p. 444-450, 2003.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal Chemical Ecology**, v. 24, p. 2039-2057, 1998.
- DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.
- 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.4 6-55, 2001.

- FERREIRA, D.F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.
- FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, L.; GALILI, G. (Eds.). **Seed Development and Germination**. New York, Marcel Dekker Inc, 1995.
- GATTI, A.B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S.C.J.G.A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2010.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.
- 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.
- HAGEMANN, T.R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J.A.; MARTIN, T.N.; PAGLIOSA, E.S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010.
- HEDGE, R.S.; MILLER, D.A. Allelopathy and autotoxicity in alfafa characterization and effects of preceding crops and residue. **Crop Science**, v. 30, p. 1255-1259, 1990.
- HESS, F.D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.
- INDERJIT; DUKE S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.
- INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.
- KATO-NOGUCHI, H. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm. **Scientia Horticulturae**, v.97, p.419-423, 2003.
- KERN, K.A.; PERGO, E.M.; KAGAMI, F.L.; ARRAES, L.S.; SERT, M.A.; ISHII-IWAMOTO, L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1095-1101, 2009.
- KHAN, M.; HUSSAIN, F.; MUSHARAF, S.; IMDADULLAH. Allelopathic effects of *Rhazya stricta* decne on seed germination and seedling growth of maize. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 30, p. 6391-6396, 2011.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estudo de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.

- LI, J.; JIN, Z. Potential allelopathic effects of *Mikania micrantha* on the seed germination and seedling growth of *Coix lacryma-jobi*. **Weed Biology and Management**, v. 10, p. 194-201, 2010.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137-147, 2006.
- MORTENSEN, D. A.; BASTIAANS L.; SATTIN, M. The role of ecology in the development of weed management systems: an outlook. **Weed Research**, v. 40, p. 49-62, 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.
- NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.
- NOVAES, P.; IMATOMI, M.; MIRANDA, M.A.F.M.; GUALTIERI, S.C.J. Phytotoxicity of leaf aqueous extract of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) on weeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 2, p. 231-239, 2013.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 401-406, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.
- PINTO, J.J.O.; GALON, L.; DAL MAGRO, T.; PROCÓPIO, S.O.; CONCENÇO, G.; PINHO, C.F.; FERREIRA, E.A. Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 767-777, 2008.
- RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- REIGOSA, M.J.; SANCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZALES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, p. 577-608, 1999.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Ed.). Cerrado: Ecologia e Flora. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 151-212.
- SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M.; MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. the possible mode of action. **Journal Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- SOUZA FILHO, A.P.S. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 607-610, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Potencial alelopático de plantas acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagem. **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 453-441, 2000.

SOUZA, F.M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S.C.J.G.A.; RODRIGUES, R.R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, p. 169-174, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed.

## CAPÍTULO III

**Avaliação fitotóxica dos extratos aquosos de folhas e cascas do caule  
de *Sapindus saponaria* L.**

**RESUMO** – A organização e dinâmica de uma comunidade são determinadas, entre outros fatores, pelo balanço das interações positivas e negativas das plantas. Para a constatação do efeito fitotóxico das espécies, o procedimento inicial consiste na técnica do bioensaio em laboratório, que emprega material biológico como indicador da ação da substância em estudo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e quantificar o potencial fitotóxico do extrato aquoso de folhas e cascas do caule de *Sapindus saponaria* L., por meio de bioensaios de germinação de diásporos e crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), assim como identificar os efeitos sobre o crescimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de gergelim. O extrato aquoso foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal para 1000 mL de água destilada, produzindo-se uma maceração de 10% (m/v). A partir deste, foram feitas diluições em água destilada para 7,5; 5,0 e 2,5%. Os extratos de folhas e cascas de *S. saponaria* foram fitotóxicos e inibiram o processo de germinação e o crescimento das plântulas de gergelim, rabanete e trigo, com efeito dependente da concentração. Verificou-se que a redução no crescimento radicular das plântulas de gergelim pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que o extrato foliar apresentou maior atividade inibitória.

**Palavras-chave:** fitotoxicidade, sabão-de-soldado, gergelim, rabanete, trigo, germinação, crescimento.

**ABSTRACT** – (Phytotoxic evaluation of aqueous extracts of *Sapindus saponaria* L. leaves and stem bark). The organization and dynamics of community are determined by the balance between positive and negative interactions of plants. For establishing the phytotoxic effect of species, the initial procedure is the technique of bioassay laboratory, which employs biological material as an indicator of the action of the test substance. Thus, the present study aimed to evaluate and quantify the phytotoxic potential of aqueous extract of *Sapindus saponaria* L. leaves and stem bark, through bioassay germination of diaspores and seedling growth of sesame (*Sesamum indicum* L.), radish (*Raphanus sativus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.), well as to identify the effects on cell growth of metaxylem in roots of sesame seedlings. The aqueous extract was prepared in a proportion of 100 g plant material dissolved in 1000 mL of distilled water, resulting in 10% (w/v) maceration. The dilutions were made with distilled water to 7.5, 5.0 and 2.5%. The extracts of *S. saponaria* leaves and bark were phytotoxic and inhibited the germination process and seedling growth sesame, radish and wheat, with concentration-dependent effect. The reduction in seedling root length of sesame may be attributed to the reduced in cells elongation of metaxylem.

Phytotoxicity of extracts varied with the receptor species, and the leaves showed the highest inhibitory activity.

**Keywords:** phytotoxicity, soapberry, sesame, radish, wheat, germination, growth.

## 1. Introdução

A organização e dinâmica de uma comunidade são determinadas, entre outros fatores, pelo balanço das interações positivas e negativas das plantas (Inderjit e Callaway, 2003). Uma das diversas formas possíveis de interação ocorre por meio da liberação de metabólitos secundários no ambiente, causando interferências diretas ou indiretas de uma planta sobre outra, em um processo conhecido como alelopatia (Rice, 1984; IAS, 2014). Nas interações ecológicas, muitos compostos do metabolismo secundário de plantas atuam como defesa química contra o ataque de insetos, microrganismos fitopatogênicos e na competição com outras plantas. Ao longo do tempo evolutivo, o processo de ação-reação entre vegetais e organismos predadores ou competidores pode ter levado à co-evolução de plantas e seus inimigos naturais, resultando na grande biodiversidade, não apenas em riqueza de espécies, mas também na variedade de metabólitos secundários em sua composição química (Macías et al., 2007).

No caso de interações alelopáticas em plantas, as interferências mais comuns incidem sobre a germinação e crescimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular das plântulas (Larcher, 1995), afetando o sucesso do estabelecimento dos indivíduos. Como consequência, podem ocorrer alterações na densidade, dominância e padrão espacial das populações, bem como na diversidade da comunidade (Chou, 1999). Por isso, plantas com potencial alelopático podem ter um papel diferencial na coexistência das espécies (Inderjit e Callaway, 2003) e na sucessão secundária (Peng et al., 2004), o que reforça sua relevância para a estruturação das comunidades vegetais. Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, caules e sementes (Putnan e Tang, 1986; Taiz e Zeiger, 2013). Para Friedman (1995), todos os órgãos da planta têm potencial para armazenar aleloquímicos, mas a quantidade e o caminho pelos quais são liberados para o ambiente diferem entre as espécies. Assim, as espécies podem apresentar diferentes atividades alelopáticas em seus órgãos, como já constataram Souza et al. (2010) em *Esenbeckia leiocarpa* Engl., Coelho et al. (2011) em *Ziziphus joazeiro* Mart, Pannacci et al. (2013) em *Helianthus annuus* L. e Anese (2014) em *Drimy brasiliensis* Miers.

Os aleloquímicos podem apresentar ação direta ou indireta sobre a planta alvo. Alterações nas propriedades e características nutricionais e, também nas populações de organismos que

habitam o solo são consideradas como efeitos indiretos. Os efeitos diretos, por sua vez, são mais estudados e compreendem alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, no crescimento celular, na expressão e síntese de DNA e RNA (Rizvi et al., 1992; Reigosa et al., 1999; Inderjit e Nilsen, 2003). Independente do modo de ação dos compostos alopáticos, estes agem provocando mudanças que afetam diretamente a divisão celular e consequentemente culminando na inibição do desenvolvimento e crescimento das plantas e outros organismos. As saponinas, os taninos e os flavonóides estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos, podendo ser liberados em condições naturais, já que são hidrossolúveis (Ferreira e Áquila 2000; Maraschin-Silva e Áquila, 2006).

Para a constatação do efeito fitotóxico das espécies, o procedimento inicial consiste na técnica do bioensaio em laboratório, que emprega material biológico como indicador da ação da substância em estudo (Inderjit e Dakshini, 1995; Souza Filho et al., 2010). Nessa técnica os fatores competitivos podem ser limitados e as condições experimentais controladas (Khanh, et al., 2006), como temperatura, luz e disponibilidade hídrica. Esse tipo de bioensaio tem sido muito criticado na literatura (Weidenhamer, 1996); porém, é por meio dele que se torna possível responder perguntas específicas sobre o potencial fitotóxico das espécies. Por exemplo, essa técnica permite identificar a presença de fitotoxinas em diferentes partes da planta (localização), as concentrações dos compostos bioativos, as espécies vulneráveis, os efeitos morfológicos sobre as plântulas e os processos fisiológicos que inibem o crescimento (Einhellig, 2002; Inderjit e Nilsen, 2003). Embora a inibição de processos fisiológicos observados em laboratório não assegure a existência de correlações desse evento com os padrões espaciais das espécies em ambientes naturais (Stowe, 1979; Borghetti et al., 2013), tais experimentos podem ajudar a demonstrar o potencial das interações aleloquímicas, além de serem de rápida execução e facilmente replicados (Inderjit e Weston, 2000). Weidenhamer et al. (1989) também ressaltam que essa prática pode ser muito útil para verificar as evidências de alelopatia antes de se realizar outras formas de investigação mais trabalhosa e de maior custo.

*Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), conhecida popularmente como sabão-de-soldado, é uma espécie arbórea nativa, pioneira, perenifólia ou semidecídua, heliófita, de médio porte, utilizada em paisagismo e em modelos de recuperação de áreas degradadas. Encontra-se habitualmente em locais úmidos, nos estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Albiero et al., 2001). A sua composição fitoquímica é bem conhecida, apresentando grande diversidade de compostos químicos, como saponinas e taninos (Albiero et al., 2001; Tsuzuki et al., 2007); porém,

os estudos sobre as atividades biológicas desta espécie têm sido concentrados, especificamente, em propriedades farmacológicas (Tsuzuki et al., 2007; Pelegrini et al., 2008).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e quantificar o potencial fitotóxico do extrato aquoso de folhas e cascas do caule de *S. saponaria*, por meio de bioensaios de germinação de diásporos e crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), assim como identificar um dos modos de ação, quantificando os efeitos dos extratos sobre o crescimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de gergelim.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Preparação dos extratos**

Folhas maduras (coloração verde-escura e textura coriácea) e cascas do caule de *S. saponaria* foram coletadas no município de São Carlos-SP (22°02' S e 47° 52' W), em maio de 2011. A região é caracterizada pelo tipo climático Aw, segundo o sistema de classificação de Köppen (1948), considerado tropical úmido com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). As folhas foram coletadas diretamente de cinco árvores, enquanto as cascas do caule foram coletadas de apenas três. Após a coleta, as folhas e cascas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, durante 72 h, e trituradas em moinho industrial (Mesh 14). Posteriormente, o material foi pesado, embalado a vácuo em sacos plásticos e armazenado sob temperatura ambiente (25 °C) até a realização dos experimentos.

O extrato aquoso bruto foi preparado a partir da mistura do material vegetal seco (pó) com água destilada em maceração de 10% de massa/volume (g/mL). O extrato permaneceu em repouso, no escuro, durante 12 h a 4°C e em seguida foi filtrado a vácuo, utilizando-se uma bomba elétrica acoplada a um funil de Buckner forrado internamente com papel de filtro (Gatti et al., 2004). O extrato resultante foi recolhido em um béquer e, a partir dele, foram feitas diluições com água destilada para 7,5; 5,0 e 2,5%.

### **2.2. Potencial osmótico e pH dos extratos**

O pH dos extratos foi medido com o peagâmetro Analion, modelo PM608, e a concentração molar, com o osmômetro automático ( $\mu$ Osmotte, modelo 5004), calculando-se posteriormente o potencial osmótico dos extratos de folhas e cascas na maior concentração (10%).

Os valores da concentração molar foram convertidos para pressão osmótica (25 °C) pela conversão de mOsm/Kg para MPa, segundo a equação 1.1 citada por Larcher (2004):

$$1\text{Osm/Kg} = 0,00832 \times T_{\text{abs}}, \quad (\text{eq. 1.1})$$

onde:

$T_{\text{abs}}$ : temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

Para avaliar o efeito osmótico dos extratos obtidos, foi realizado bioensaios de germinação e crescimento com diásporos de gergelim, rabanete e trigo em soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) a -0,1; -0,2 e -0,3 MPa, além do controle (0 MPa), segundo recomendações de Villela et al. (1991). O experimento foi realizado utilizando-se a mesma metodologia descrita para os bioensaios de germinação e crescimento.

### 2.3. Bioensaio de germinação

As quatro concentrações obtidas a partir do extrato aquoso de folhas e cascas de *S. saponaria* foram aplicadas nos diásporos de gergelim (*Sesamum indicum*, Pedaliaceae), rabanete (*Raphanus sativus*, variedade Vip Crimson, Brassicaceae) e trigo (*Triticum aestivum*, cultivar BRS 264, Poaceae).

O bioensaio de germinação foi conduzido em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL do extrato ou água destilada (tratamento controle). Cada placa foi coberta por uma película de plástico transparente, para evitar evaporação, sendo tampadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 30 diásporos. O experimento foi instalado em câmara de germinação (B.O.D.) a 25 °C para os diásporos de rabanete (Borella et al., 2012) e trigo (Silva et al., 2008) e, a 28 °C para as sementes de gergelim (Gatti et al., 2010), sob fotoperíodo de 12 h. As leituras foram realizadas a cada 12 h, durante os sete primeiros dias, e em intervalos de 24 h, até a estabilização da germinação, adotando-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação (Labouriau, 1983). Foram avaliadas as medidas de germinabilidade (G), tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ ), velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ), velocidade de germinação de Maguire (VG), incerteza (I) e sincronia (Z) (Ranal e Santana, 2006).

O termo diásporo foi utilizado ao longo do texto para designar todos os tipos de unidades de dispersão estudadas. Quando o trigo foi referido, utilizou-se o nome específico de seu diásporo, no caso, uma cariopse. O termo semente foi utilizado para a unidade de dispersão de gergelim e rabanete.

## 2.4. Bioensaio de crescimento de plântulas

Na análise de crescimento de plântulas de gergelim, rabanete e trigo, as unidades de dispersão foram previamente germinadas em água destilada. Plântulas com 3 mm de raiz primária foram transferidas para caixas de plástico transparente (15 x 10 x 5 cm), contendo como substrato duas folhas de papel de filtro umedecido com 8 mL de água destilada (controle) ou extratos de folhas e cascas, nas mesmas concentrações adotadas para o teste de germinação.

As caixas foram tampadas e mantidas em B.O.D. a 25 °C para os diásporos de rabanete e trigo e, a 28 °C para as sementes de gergelim, sob fotoperíodo de 12 h. Utilizaram-se quatro repetições de 10 plântulas, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após sete dias do transplante, foram avaliados o comprimento inicial das plântulas e a presença de anomalias. O comprimento da parte aérea (do colo até o meristema caulinar) e da raiz primária (do colo até o meristema radicular) foi medido com auxílio de um paquímetro digital. As plântulas foram classificadas em normais e anormais, de acordo com as especificações de Brasil (2009), sendo consideradas anormais aquelas que não mostraram potencial para continuar o seu desenvolvimento, com o sistema radicular ou a parte aérea apodrecidos, necrosados, ausentes ou totalmente atrofiados.

## 2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema)

Plântulas de gergelim cresceram em soluções do controle e do extrato aquoso de folhas de *S. saponaria*, nas mesmas condições adotadas para o bioensaio de crescimento. Decorrido quatro dias, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, o segmento da raiz primária foi removido e imerso em álcool 70% (Gatti et al., 2010).

A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997). As raízes ficaram imersas em álcool (70%), durante cinco dias, e depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25%) a 60 °C, durante 48 h, período em que foi observado a clarificação do material.

Em seguida, o material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina ( $C_{20}H_{19}N_4C_1$ ) e soda cáustica (NaOH a 10%), e transferido para estufa, a 60 °C, por 24 h. Após a coloração, a raiz foi fixada em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro repetições de raízes primárias crescidas em diferentes concentrações dos extratos e no controle. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, da região central em

direção ao colo (Gatti et al., 2010), no aumento de 20 vezes. A partir dessas imagens, foram medidas até 15 células centrais do metaxilema, utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0.

## **2.6. Análise estatística**

Os dados obtidos para cada uma das características avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando essas duas pressuposições foram atendidas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. A falta de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização dos testes não-paramétricos, Kruskal-Wallis seguido de Dunn para comparações binárias, a 0,05 de significância. Procedeu-se à regressão linear ou quadrática, quando o resultado da ANOVA foi significativo. A qualidade do ajuste dos modelos foi aferida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). As variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos foram representadas nas figuras com os valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Para comparação dos efeitos ocasionados pelos diferentes órgãos de *S. saponaria*, foi realizada a análise conjunta para as características em que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes, 1990). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2003) e SPSS 16.0.

## **3. Resultados**

### **3.1. Bioensaios de germinação e crescimento de plântulas**

Com relação às características físico-químicas, os valores de pH obtidos para os extratos de folha e casca de *S. saponaria* variaram entre 6,35 e 6,53 e o potencial osmótico entre -0,25 e -0,19 MPa, respectivamente. A partir dos resultados dos bioensaios de germinação e de crescimento, utilizando-se PEG 6000, foi constatado que estes potenciais não interferiram significativamente sobre a germinabilidade, tempo médio e desenvolvimento das plântulas utilizadas como bioindicadoras.

O extrato aquoso de folhas de *S. saponaria* apresentou potencial fitotóxico no processo de germinação dos diásporos de gergelim, rabanete e trigo. O rabanete foi a espécie mais sensível e que sofreu maior inibição na germinação, sendo que na concentração 10% nenhuma semente germinou. Além disso, o extrato reduziu linearmente a germinabilidade, a velocidade média, a velocidade de germinação de Maguire e a sincronia (9,69%; 0,0028 h<sup>-1</sup>; 0,1130 sementes h<sup>-1</sup> e

0,0292 para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato); e, em contrapartida, promoveu aumento linear no tempo médio de germinação (7,59 h para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato) (Figura 1).

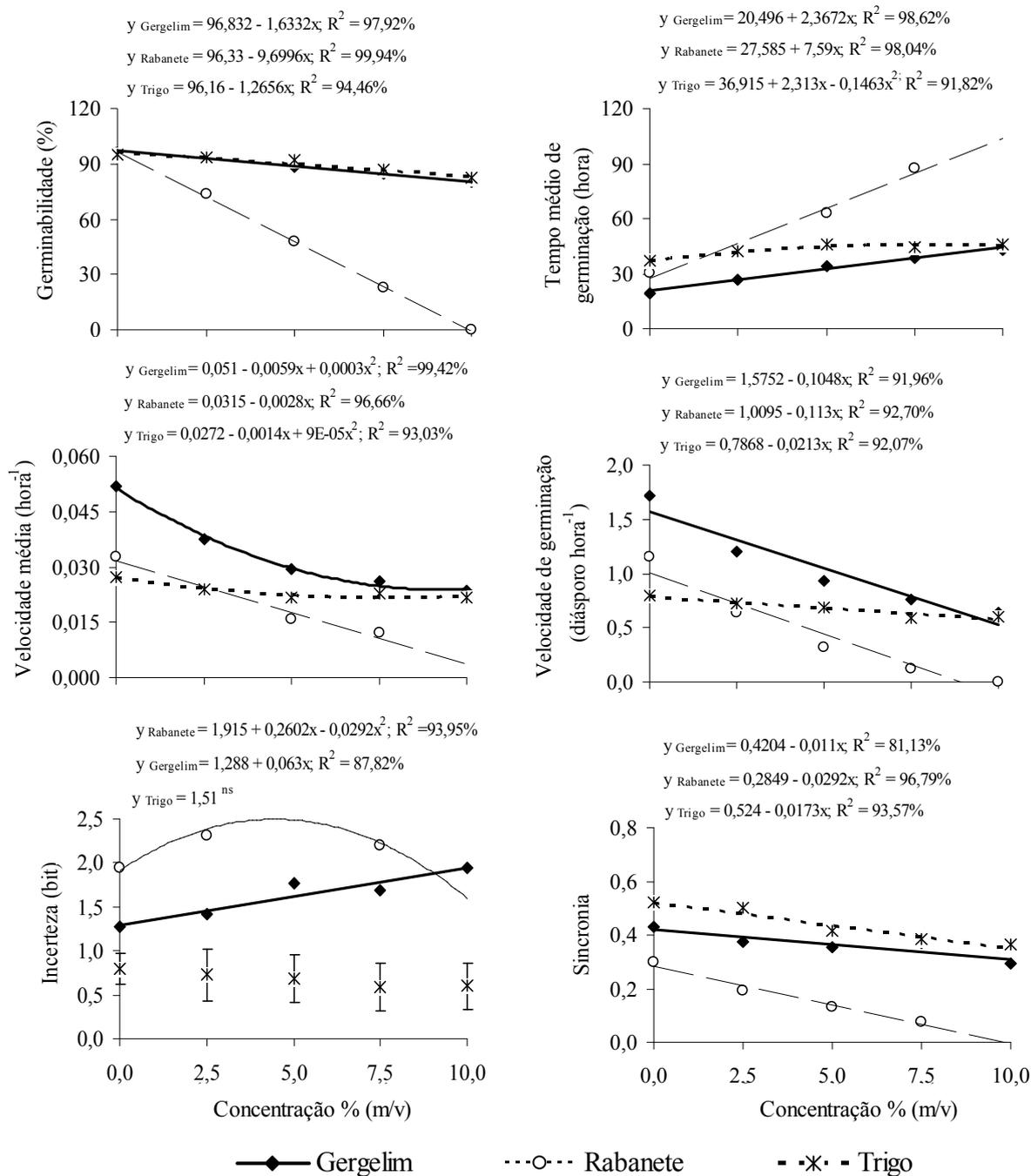


Figura 1. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Para as sementes de gergelim expostas ao extrato foliar, observou-se decréscimo linear na germinabilidade e na velocidade de germinação de Maguire (1,63% e 0,1048 sementes h<sup>-1</sup> para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato), enquanto a velocidade média de germinação atingiu seu valor mínimo (0,0219 h<sup>-1</sup>) na concentração estimada de 9,83%. Como consequência disto, o tempo médio de germinação aumentou linearmente em 2,37 h para cada adição 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato. A incerteza sofreu aumento linear de 0,063 bits, enquanto a sincronia foi reduzida linearmente em 0,011 para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato foliar adicionado; isso mostra que o processo foi assíncrono e que na concentração 10% houve falta de sobreposição da germinação das sementes de gergelim no tempo (Figura 1).

O trigo foi a espécie receptora que apresentou menor sensibilidade aos tratamentos no bioensaio de germinação. No entanto, o extrato foliar reduziu linearmente a germinabilidade, a velocidade de germinação de Maguire e a sincronia (1,26%; 0,0213 sementes h<sup>-1</sup> e 0,0173 para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato), apresentando menores taxas de decrementos quando comparadas com as do gergelim e rabanete. O tempo e a velocidade média de germinação atingiram seus valores máximo (46,06 h) e mínimo (0,0216 h<sup>-1</sup>) nas concentrações estimadas de 7,90 e 7,78%, respectivamente (Figura 1).

O extrato aquoso de folhas de *S. saponaria* exerceu efeito inibitório significativo no crescimento das plântulas receptoras. A ausência de plântulas normais de rabanete e gergelim, submetidas à ação do extrato foliar, pode ser notada a partir da concentração 5 e 7,5%, respectivamente, enquanto a porcentagem de plântulas normais de trigo variou de 100% (controle) para 40% (concentração 5%) (Figura 2). O comprimento da parte aérea das plântulas de gergelim e trigo apresentou, respectivamente, decréscimo linear de 1,80 e 4,85 mm para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato; enquanto para o rabanete, o menor valor (12,28 mm) foi registrado na concentração estimada de 9,20%. O comprimento mínimo das raízes de gergelim (0,66 mm), rabanete (0 mm) e trigo (17,42) foi observado nas concentrações 7,27; 6,85 e 7,36%, respectivamente (Figura 2). Nesse bioensaio, o crescimento das plântulas de trigo foi o que sofreu maior variação entre o tratamento controle e a concentração 10%, principalmente no comprimento da parte aérea.

O extrato aquoso das cascas do caule de *S. saponaria* exerceu efeito fitotóxico para algumas variáveis analisadas no processo de germinativo, inibindo, principalmente, a germinação das sementes de rabanete. Para essas sementes tratadas com extrato das cascas, observou-se decréscimo linear na germinabilidade, na velocidade média e na velocidade de germinação de Maguire (1,33% e 0,0012 h<sup>-1</sup> e 0,0482 sementes h<sup>-1</sup> para cada 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato adicionado); enquanto, o tempo médio de germinação apresentou acréscimo linear de 1,34 h para cada adição de 0,01 g mL<sup>-1</sup> de extrato (Figura 3). Entretanto, esse extrato não inibiu a germinabilidade dos diásporos de gergelim e

trigo, interferindo, apenas, no tempo, na velocidade média e na velocidade de germinação de Maguire (Figura 3).

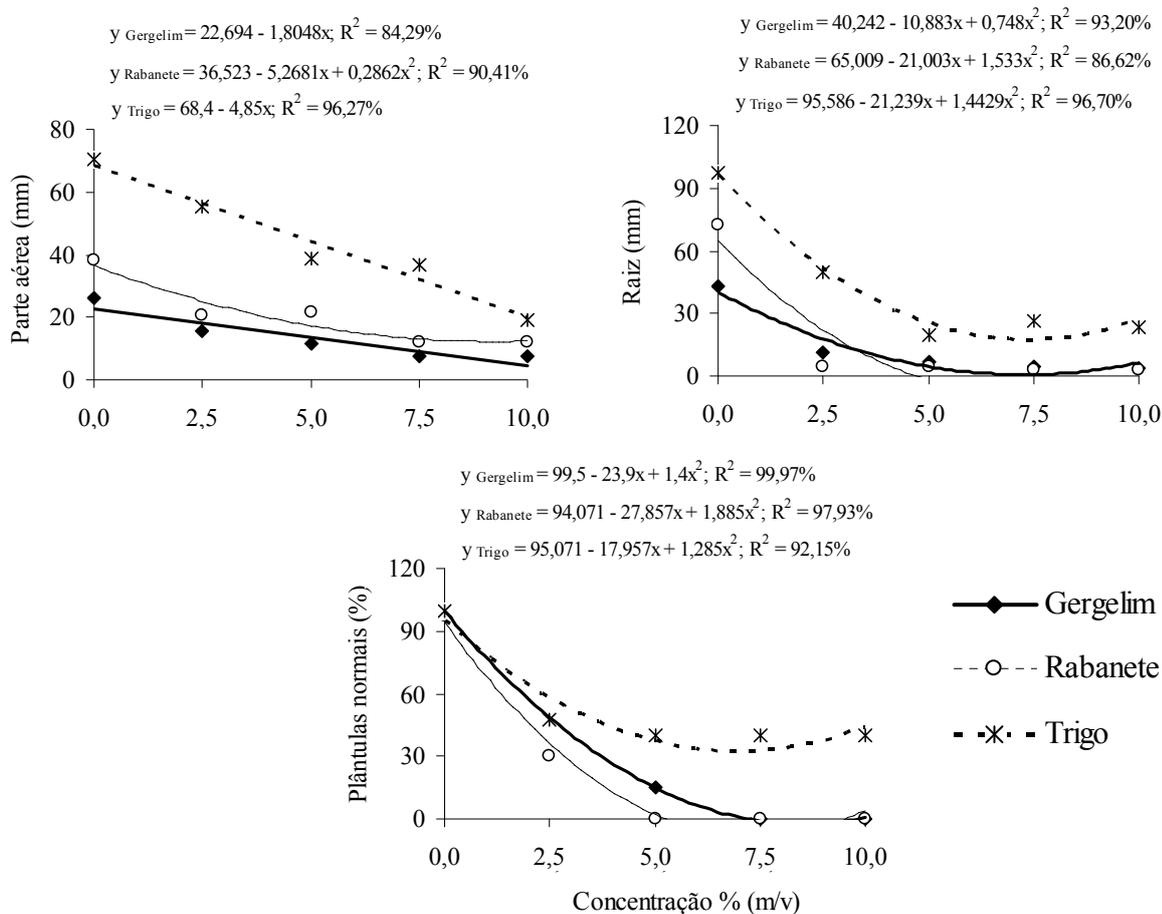


Figura 2. Efeito dos extratos de folhas de *Sapindus saponaria*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

Para as variáveis analisadas no processo de germinação dos diásporos de gergelim, rabanete e trigo que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sob a ação dos extratos de folhas e cascas, as regressões não puderam ser aplicadas e os valores encontram-se nas respectivas figuras e na tabela 2. Dentre estes valores, a análise estatística não detectou diferenças significativas para a incerteza e sincronia, uma vez que estes apresentaram desvio padrão elevado (Figura 3 e Tabela 2). Esta informação indica a alta variabilidade presente nesses diásporos e a importância de se analisar outras variáveis e testes para detectar o efeito aleloquímico dos extratos testados.

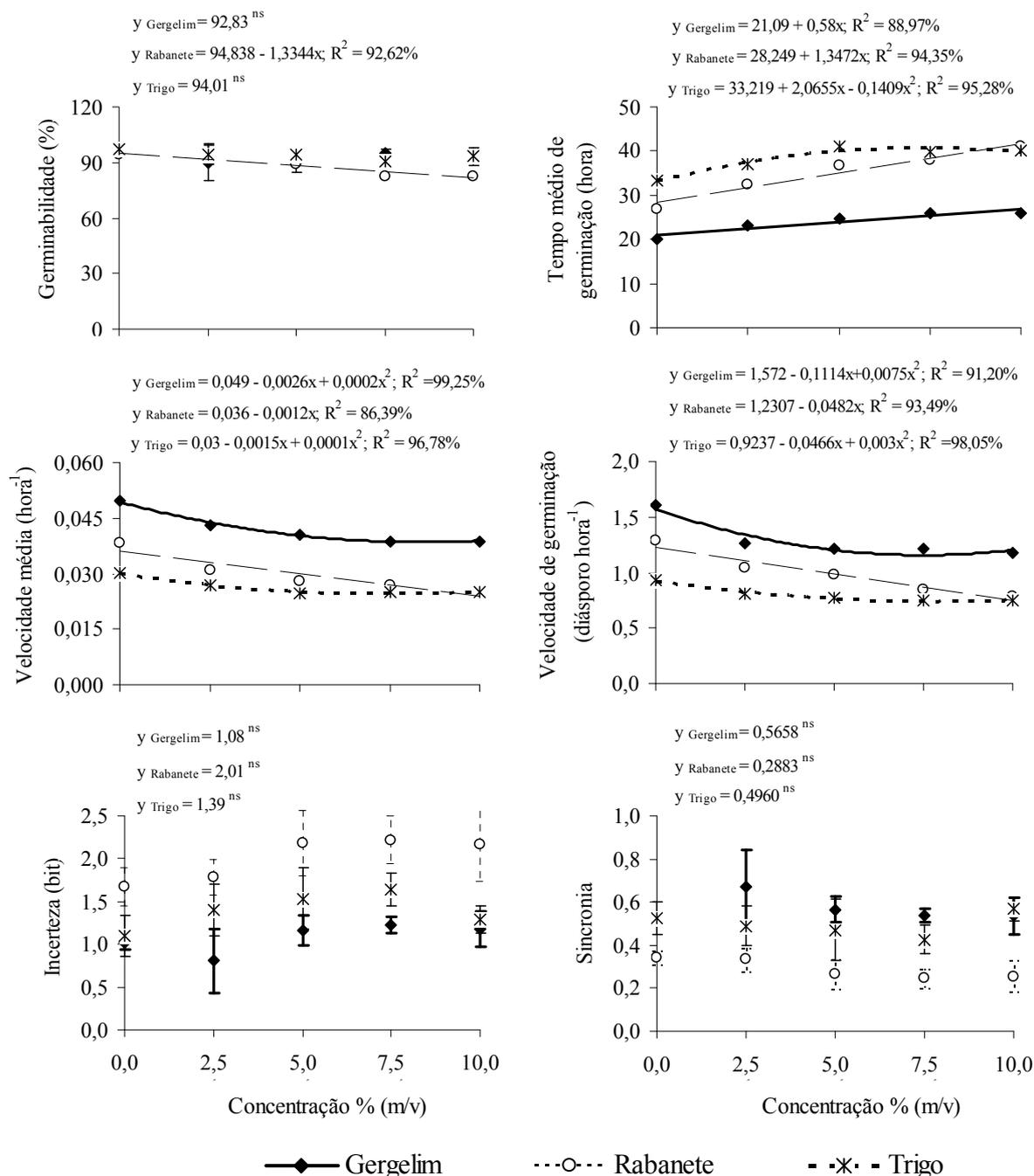


Figura 3. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação de Maguire, incerteza e sincronia do processo de germinação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de cascas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

O crescimento das plantas receptoras também foi inibido pelo extrato das cascas de *S. saponaria*. A porcentagem de plântulas normais de gergelim variou de 100% (controle) para 55% (concentração 10%), enquanto que para o rabanete, todas as plântulas crescidas nas concentrações 2,5 e 7,5% foram consideradas anormais. As plântulas de gergelim (11,48 mm), rabanete (9,77 mm) e trigo (44,02) apresentaram menores comprimentos da parte aérea nas concentrações 9,55; 7,04 e

7,10%, respectivamente. O comprimento mínimo das raízes das plântulas de gergelim (2,24 mm), rabanete (0 mm) e trigo (33,26 mm) foi observado nas concentrações estimadas de 6,94; 6,78 e 7,20%, respectivamente (Figura 4). As plântulas de rabanete, seguido do trigo e gergelim, foram as mais afetadas pelo extrato da casca, apresentando as maiores reduções, principalmente no crescimento da raiz.

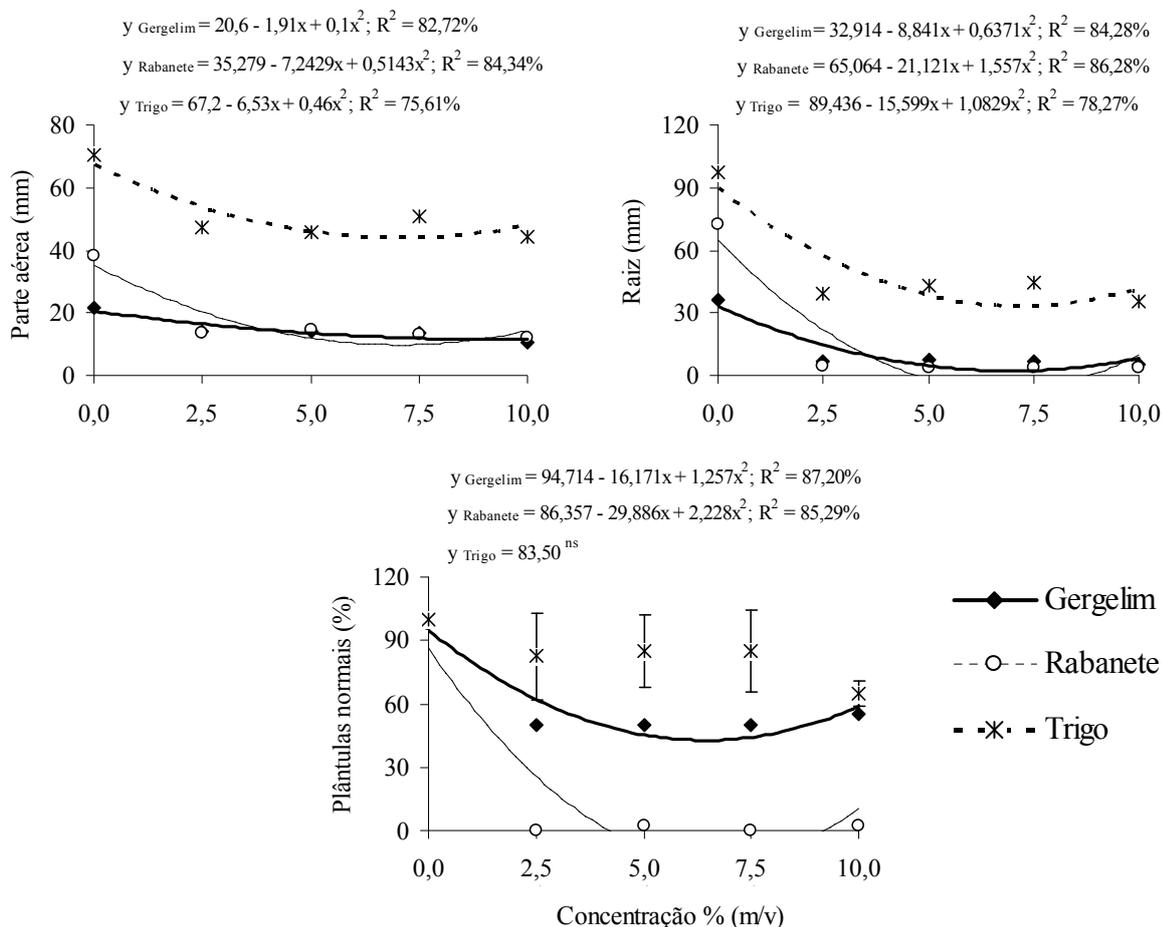


Figura 4. Efeito dos extratos de cascas de *Sapindus saponaria*, em diferentes concentrações, no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

As plântulas submetidas à ação do extrato de folhas e cascas apresentaram algum tipo de anormalidade. De modo geral, as principais anomalias observadas foram o desenvolvimento fraco, a desproporção entre a raiz e parte aérea e a atrofia das estruturas das plântulas. Na maioria dos casos, os danos foram causados sobre o sistema radicular, sendo pouco comum a existência de anomalias graves na parte aérea. Nas raízes, observamos com maior frequência anomalias como necrose, atrofia, geotropismo negativo e oxidação da coifa. O hipocótilo retorcido e pequenas necroses nos cotilédones foram as alterações mais comuns na parte aérea.

O extrato de folha de *S. saponaria*, quando comparado ao de casca, foi o que provocou maior efeito inibitório no processo de germinação dos diásporos de gergelim, rabanete e trigo; esse efeito foi observado para todas as variáveis analisadas (Tabela 1). O crescimento das plântulas de trigo também foi mais afetado pelo extrato foliar. Porém, o extrato da casca foi o que mais inibiu o crescimento da parte aérea e causou maior anormalidade nas plântulas de rabanete. Para as plântulas de gergelim, os extratos de folha e casca exerceram efeito similar no crescimento da parte aérea e da raiz; no entanto, a proporção de plântulas normais foi menor no tratamento com extrato foliar (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito dos extratos de folhas e cascas de *Sapindus saponaria* na germinação de diásporos e no crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

Variáveis (unidades)	Extratos	
	Folha	Casca
<i>Sesamum indicum</i>		
G: germinabilidade (%)	88,67 b	92,83 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (hora)	32,29 b	23,99 a
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação (hora <sup>-1</sup> )	0,0337 b	0,0422 a
VG: velocidade de germinação (semente hora <sup>-1</sup> )	1,05 b	1,30 a
I: incerteza (bit)	1,62 b	1,08 a
Z: sincronia	0,3655 b	0,5658 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	13,67 a	14,79 a
CR: comprimento da raiz (mm)	13,73 a	12,62 a
PN: plântulas normais (%)	32,50 b	61,00 a
<i>Raphanus sativus</i>		
G: germinabilidade (%)	47,83 b	88,17 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (hora)	56,05 b	34,99 a
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação (hora <sup>-1</sup> )	0,0211 b	0,0299 a
VG: velocidade de germinação (semente hora <sup>-1</sup> )	0,5558 b	0,9896 a
I: incerteza (bit)	2,25 b	2,0056 a
Z: sincronia	0,1754 b	0,2883 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	20,92 a	18,21 b
CR: comprimento da raiz (mm)	17,52 a	17,81 a
PN: plântulas normais (%)	25,50 a	20,50 b
<i>Triticum aestivum</i>		
G: germinabilidade (%)	89,83 b	94,00 a
$\bar{t}$ : tempo médio de germinação (hora)	42,99 b	38,26 a
$\bar{v}$ : velocidade média de germinação (hora <sup>-1</sup> )	0,0235 b	0,0263 a
VG: velocidade de germinação (semente hora <sup>-1</sup> )	0,6803 b	0,8028 a
I: incerteza (bit)	1,5114 a	1,3936 a
Z: sincronia	0,4376 b	0,4960 a
CPA: comprimento da parte aérea (mm)	44,15 b	51,84 a
CR: comprimento da raiz (mm)	43,50 b	52,07 a
PN: plântulas normais (%)	53,50 b	83,50 a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Tabela 2. Germinação de diásporos e crescimento das plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) submetidas à ação dos extratos de folha e casca de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

Variáveis (unidades)	Extratos	Controle	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%	Estatística			
							<i>W</i> (P)	<sup>1</sup> <i>F</i> (P)	<sup>2</sup> <i>F</i> (P)	<i>H</i> (P)
<i>Sesamum indicum</i>										
<i>G</i> (%)	Casca	96,67 ± 2,72 a	90,00 ± 9,81 a	90,00 ± 5,44 a	95,00 ± 1,92 a	92,50 ± 1,67 a	0,850 (0,005)	<b>1,790</b> (0,183)		1,272 (0,3245)
<i>I</i> (bit)	Casca	1,0156 ± 0,0879 a	0,8094 ± 0,3757 a	1,1608 ± 0,1707 a	1,2278 ± 0,0979 a	1,1844 ± 0,2098 a	0,844 (0,004)	<b>2,143</b> (0,126)		2,518 (0,0852)
<i>Z</i>	Casca	0,5170 ± 0,0209 a	0,6731 ± 0,1658 a	0,5660 ± 0,0620 a	0,5358 ± 0,0313 a	0,5371 ± 0,0856 a	0,766 (0,000)	<b>2,674</b> (0,073)		1,952 (0,1539)
<i>Raphanus sativus</i>										
<i>I</i> (bit)	Casca	1,6722 ± 0,2171 a	1,7898 ± 0,2067 a	2,1782 ± 0,3793 a	2,2154 ± 0,2753 a	2,1725 ± 0,4381 a	<b>0,947</b> (0,326)	<b>0,844</b> (0,519)		2,584 (0,0797)
<i>Z</i>	Casca	0,3418 ± 0,0283 a	0,3334 ± 0,0519 a	0,2673 ± 0,0689 a	0,2439 ± 0,0443 a	0,2551 ± 0,0711 a	<b>0,939</b> (0,227)	<b>1,299</b> (0,315)		2,749 (0,0675)
<i>Triticum aestivum</i>										
<i>G</i> (%)	Casca	97,50 ± 1,67 a	94,17 ± 5,00 a	94,17 ± 1,67 a	90,83 ± 4,19 a	93,33 ± 4,71 a	<b>0,906</b> (0,053)	<b>1,993</b> (0,147)		1,618 (0,2212)
<i>I</i> (bit)	Casca	1,0983 ± 0,2343 a	1,4016 ± 0,3012 a	1,5355 ± 0,3583 a	1,6427 ± 0,1952 a	1,2899 ± 0,1659 a	<b>0,956</b> (0,461)	<b>0,868</b> (0,506)		2,653 (0,0743)
<i>I</i> (bit)	Folha	1,2455 ± 0,1768 a	1,3842 ± 0,2916 a	1,7586 ± 0,2683 a	1,5346 ± 0,2676 a	1,6339 ± 0,2602 a	<b>0,955</b> (0,447)	<b>0,283</b> (0,885)		2,496 (0,0871)
<i>Z</i>	Casca	0,5259 ± 0,0756 a	0,4885 ± 0,0917 a	0,4708 ± 0,1424 a	0,4268 ± 0,0647 a	0,5681 ± 0,0530 a	<b>0,958</b> (0,503)	<b>1,004</b> (0,436)		1,401 (0,2811)
<i>PN</i> (%)	Casca	100,00 ± 0,00 a	82,50 ± 20,61 a	85,00 ± 17,32 a	85,00 ± 19,15 a	65,00 ± 5,77 a	0,748 (0,000)	13,80 (0,000)		2,756 (0,0671)

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey ou Dunn a 0,05 de probabilidade; *G*: germinabilidade; *I*: incerteza; *Z*: sincronia; *PN*: plântulas normais; *W*: estatística do teste de Shapiro-Wilk; valores em negrito indicam que os resíduos seguem distribuição normal ( $P > 0,01$ ); <sup>1</sup>*F*: estatística do teste de Levene; valores em negrito indicam homogeneidade entre as variâncias ( $P > 0,01$ ); <sup>2</sup>*F*: estatística do teste de Snedecor; valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA;  $P < 0,05$ ); *H*: estatística do teste de Kruskal-Wallis, valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações ( $P < 0,05$ ); *P*: probabilidade.

### 3.2. Estudo anatômico das raízes de gergelim (células do metaxilema)

Considerando que o extrato foliar de *S. saponaria* apresentou maior atividade inibitória, o estudo anatômico das raízes de plântulas de gergelim possibilitou uma melhor visualização dos efeitos fitotóxicos desse extrato em nível celular. O grupo controle teve predomínio para as células pertencentes aos tamanhos entre 125-150  $\mu\text{m}$  (52,5%), não apresentando células menores que 100  $\mu\text{m}$ . As plântulas que cresceram sob a influência do extrato de folhas apresentaram células distribuídas em diferentes classes de tamanhos, sendo que com o aumento da concentração do extrato essa distribuição se tornou mais homogênea. As células do metaxilema das raízes de gergelim crescidas na presença do extrato foliar, nas concentrações 2,5 e 5,0%, apresentaram predominância na classe de tamanho entre 50-75  $\mu\text{m}$ , enquanto que nas concentrações 7,5 e 10%, 57,5 e 77,5% das células exibiram, respectivamente, tamanhos entre 25-50  $\mu\text{m}$  (Figuras 5 e 7).

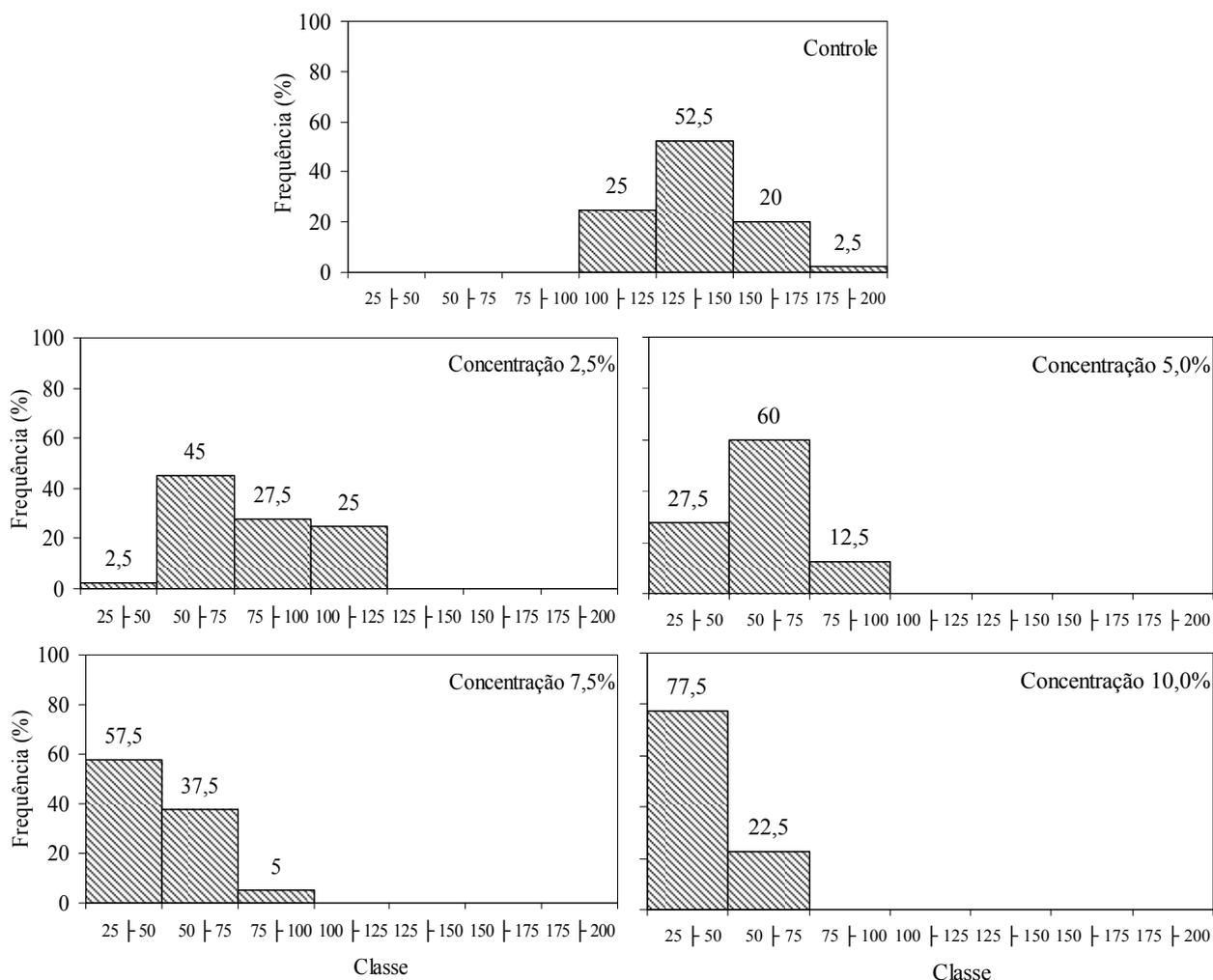


Figura 5. Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

O efeito do extrato de folhas de *S. saponaria* sobre o comprimento das células do metaxilema das raízes de gergelim foi dependente da concentração. O menor comprimento dessas células (44,61  $\mu\text{m}$ ) foi registrado na concentração estimada de 8,15% (Figura 6).

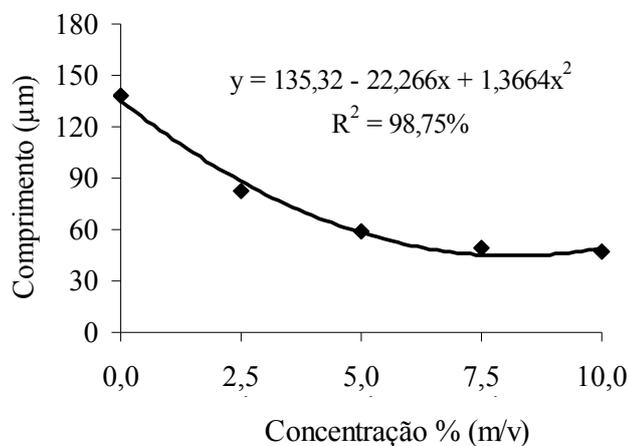


Figura 6. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do extrato de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

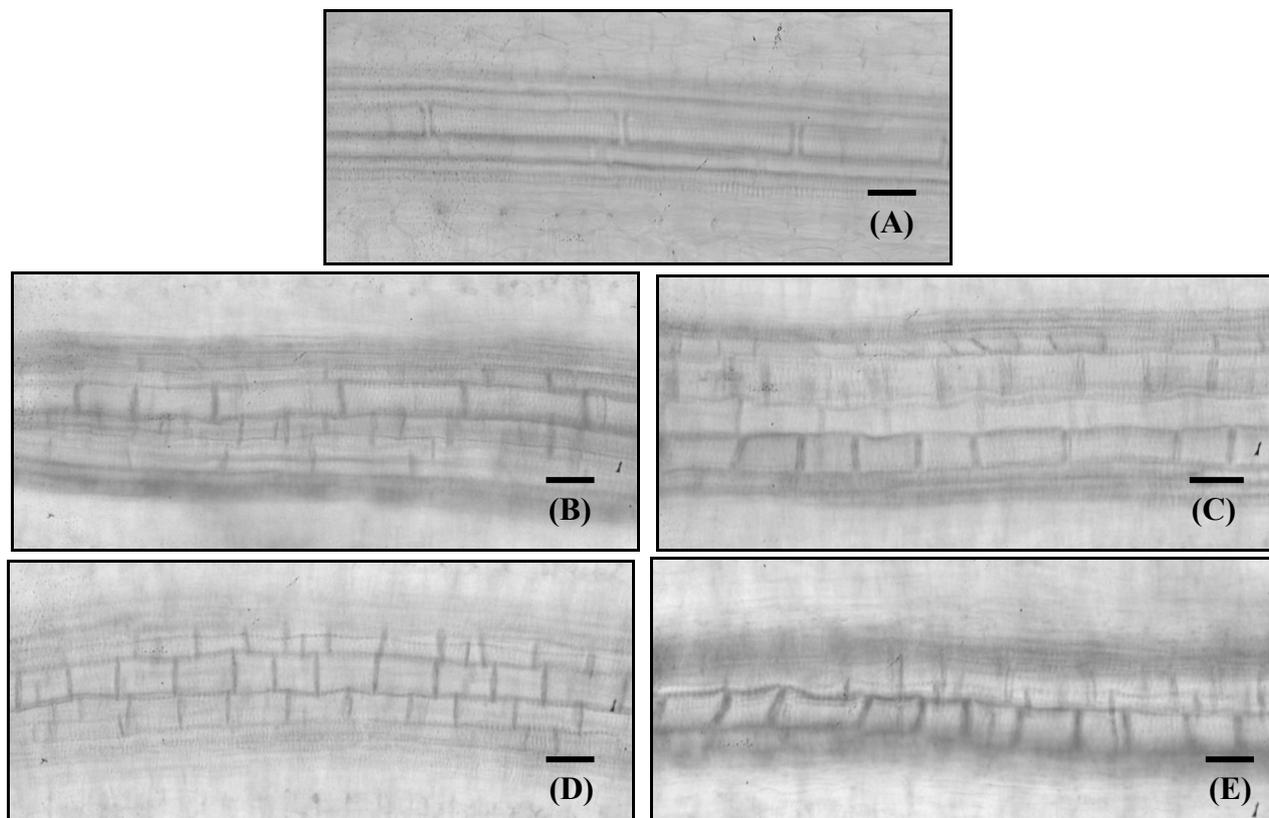


Figura 7. Fotomicrografias das células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim submetidas à ação do controle (A) e dos extratos de folhas de *Sapindus saponaria* nas concentrações 2,5%(B), 5% (C), 7,5% (D) e 10% (E). Escala = 50 $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussão

O potencial osmótico e o pH encontrado nos extratos de folhas e cascas de *S. saponaria* não interferiram significativamente na germinação dos diásporos e desenvolvimento das plântulas receptoras. Outros trabalhos corroboram com esses resultados, evidenciando que apenas valores extremos, de pH e potencial osmótico, podem interferir nas características avaliadas (Gatti et al., 2004, Sodaeizadeh et al., 2009; Zhang et al., 2010). Assim, pode-se afirmar que os efeitos inibitórios observados sobre a germinação e crescimento de plântulas tenham acontecido, principalmente, devido às fitotoxinas alelopáticas presentes nos diferentes órgãos de *S. saponaria*.

De maneira geral, os extratos se mostraram fitotóxicos e potencialmente inibidores da germinação dos diásporos de gergelim, rabanete e trigo. Trabalhos prévios evidenciaram que a germinação dos diásporos de gergelim, rabanete e trigo não foi afetada por extratos aquosos foliares de plantas doadoras, tais como *Eugenia dysenterica* DC. (Pina et al., 2009), *Jatropha curcas* L. (Rejila e Vijayakumar, 2011), *A. esperanzae* (Gatti et al., 2010) e *Euphorbia helioscopia* L. (Tanveer et al., 2010). Ao contrário destes estudos, os extratos foliares de *S. saponaria* afetaram a germinação desses diásporos, o que indica que a espécie pode conter compostos com elevado potencial fitotóxico em suas folhas. A velocidade de germinação foi mais afetada do que a porcentagem de diásporos germinados, como já relatado em diversos estudos (Periotto et al., 2004; Souza et al., 2010; Grisi et al., 2013a). Dessa forma, um fator importante ao se utilizar a germinação de sementes como indicador do efeito dos aleloquímicos está vinculado ao número de variáveis analisadas. A simples determinação da germinabilidade das sementes não é suficiente para determinar a influência do extrato testado sobre a planta alvo (Ferreira e Áquila, 2000). Outras variáveis podem ser utilizadas para a avaliação da fitotoxicidade, como a velocidade e tempo médio de germinação, coeficiente de variação do tempo e sincronia do processo de germinação (Ranal e Santana, 2006; Grisi et al., 2013b).

Os extratos de folhas e cascas de *S. saponaria* também causaram anormalidades e reduziram o crescimento das plântulas de gergelim, rabanete e trigo. O desenvolvimento das plântulas foi mais sensível à ação dos extratos do que a germinação de sementes (ex.: Gatti et al., 2010; Souza et al., 2010; Grisi et al., 2013a), sendo a redução do crescimento mais acentuada no sistema radicular do que na parte aérea. Essa maior inibição da raiz em relação ao crescimento da parte aérea foi observada em vários estudos alelopáticos e fitotóxicos empregando extratos aquosos obtidos diretamente de tecidos de plantas (Oliveira et al., 2004; Maraschin-Silva e Áquila 2006; Carmo et al., 2007; Pina et al., 2009; Grisi et al., 2012; Borghetti et al., 2013; Mendes et al., 2013). Porém, para o trigo a raiz foi tão sensível quanto a parte aérea quando submetida em contato com os extratos de folhas e cascas.

A inibição decorrente no desenvolvimento da raiz é o principal fator que indica a sensibilidade da planta aos aleloquímicos (Souza Filho e Duarte, 2007). Fatores como o escurecimento, endurecimento e a fragilidade das raízes são resultantes da ação de substâncias tóxicas presentes nos extratos (Cruz-Ortega et al., 1998). Além disso, a ocorrência de redução de tamanho e necrose radicular pode ser oriunda da ação de saponinas (Soares e Vieira, 2000), substância predominantemente presente nos extratos dos diferentes órgãos de *S. saponaria* (Tsuzuki et al., 2007; Pelegrini et al., 2008). Segundo Correia et al. (2005), este efeito é mais pronunciado nas raízes devido ao seu contato direto e prolongado com os extratos. Além disso, as superfícies de raízes primárias são mais permeáveis a fitotoxinas em comparação às superfícies do hipocótilo devido presença de uma camada de cutícula protetora menos pronunciada sobre a raiz primária, o que pode resultar numa maior penetração e concentração destes compostos dentro do tecido radicular (Yoshimura et al., 2011). Uma vez em contato com a raiz, os compostos alelopáticos podem influenciar diretamente o seu crescimento, pois interferem na divisão celular, na permeabilidade de membranas e na atividade de enzimas (Singh et al., 2006; Teerarak et al., 2012).

A inibição da germinação das sementes e do crescimento inicial das plântulas é a etapa mais afetada, e os efeitos fisiológicos causados por interações alelopáticas são respostas secundárias de efeitos primários que ocorrem no metabolismo das plantas (Pedrol et al., 2006). Assim, a redução do crescimento das raízes de plântulas de gergelim, ocasionada pelos extratos de folhas e cascas de *S. saponaria*, pode estar associada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. Este resultado está de acordo com o apresentado por Gatti et al. (2010), que investigaram o efeito de extratos aquosos de *A. esperanzae* sobre o desenvolvimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de gergelim. Os autores discutem que a provável interferência de aleloquímicos na redução do tamanho das células pode estar associada a alterações na concentração de fitormônios.

A atividade fitotóxica varia dependendo da concentração do extrato, das espécies alvo e dos tecidos da planta a partir da qual os produtos químicos são extraídos (Sodaeizadeh et al., 2009; Borella et al., 2014). De acordo com outros autores, o efeito inibitório sobre a germinação e crescimento das plântulas acentua com aumento da concentração dos extratos, em uma relação dose-dependente (Batish et al., 2007; Ashrafi et al., 2009; Zhang et al., 2010; Borella et al., 2012; Borella et al., 2014). Mendes et al. (2013) ao analisar os efeitos fitotóxicos da casca do caule de *Persea venosa* Nees & Mart. sobre os diásporos e plântulas de milho, soja, alface e rabanete, constataram que os extratos foram mais ativos nas maiores concentrações; o que também foi observado no presente estudo. Além disso, os resultados deste trabalho mostraram que as espécies alvo respondem de maneira distinta aos extratos, confirmando que a suscetibilidade dessas espécies às substâncias fitotóxicas, sob condições de laboratório, depende de suas características fisiológicas e bioquímicas (Kobayashi, 2004).

De forma geral, os extratos de folhas de *S. saponaria* foram os que provocaram maior inibição na germinação e no crescimento das plântulas receptoras. As alterações provocadas pelos extratos das cascas do caule foram menos intensas, principalmente no processo de germinação dos diásporos. Resultados similares foram observados por Souza et al. (2010), que encontraram efeitos fitotóxicos mais efetivos nos extratos de folhas de *E. leiocarpa* do que nos extratos provenientes das cascas. Essa diferença na intensidade dos efeitos provocados pelos extratos de cascas e folhas reforça a afirmação de que a concentração dos aleloquímicos pode variar entre os órgãos da planta (Larcher, 1995; Shukla et al., 2003; Tanveer et al., 2010).

Os testes de germinação de sementes e crescimento de plântulas podem ser úteis para a determinação do espectro de ação dos extratos testados, sendo importantes no planejamento das demais etapas de investigação. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) e rabanete, consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática (Souza Filho et al., 2010; Tur et al., 2010; Cremones et al., 2013). O uso de espécies sensíveis é importante na detecção da presença de compostos nocivos ao desenvolvimento vegetal; porém, não possibilitam determinar o quão importante é essa influência, já que a maioria das espécies cultivadas ou espontâneas não é tão sensível quanto essas espécies bioindicadoras. Portanto, é importante o conhecimento dos grupos taxonômicos vegetais que possam sofrer maior influência do composto estudado, a fim de direcionar o desenvolvimento das futuras investigações para o controle desses grupos em campo.

## 5. Conclusão

Os extratos de folhas e cascas de *S. saponaria* foram fitotóxicos e inibiram o processo de germinação e o crescimento das plântulas de gergelim, rabanete e trigo, com efeito dependente da concentração. Verificou-se que a redução no crescimento radicular das plântulas de gergelim pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que o extrato foliar apresentou maior atividade inibitória.

## 6. Referências

ALBIERO, A.L.M.; BACCHI, E.M.; MOURÃO, K.S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.

ANESE, S. **Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis* Miers e identificação de compostos com atividade fitotóxica e inseticida**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ASHRAFI, Z.Y.; SADEGHI S.; MASHHADI, H.R. Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of seedling quack grass (*Agropyrum repens*). **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 22, p. 37-43, 2009.

BATISH, D.R.; ARORA, K.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**, v. 26, p. 566-571, 2007.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M.; VILLELA, F.A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M.; VILLELA, F.A. Desempenho de sementes e plântulas de rabanete sob ação de extrato aquoso de folhas de *Trema micrantha* (Ulmaceae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 108-116, 2014.

BORGHETTI, F.; LIMA, E.C.; SILVA, L.C.R. A simple procedure for the purification of active fractions in aqueous extracts of plants with allelopathic properties. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 1, p.50-53. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

CARMO, F.M.S.; LIMA BORGES, E.E.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 697-705, 2007.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 609-636, 1999.

COELHO, M.F.B.; MAIA, S.S.S.; OLIVEIRA, A.K.; DIOGENES, F.E.P. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 108-111. 2011.

CORREIA, N.M.; CENTURION, M.A.P.C.; ALVES, P.L.C.A. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v. 35, p. 498-503, 2005.

CREMONEZ, P.A.; FEIDEN, A.; SANTOS, R.F.; BASSEGIO, D.; ROSSI, E.; NADALETI, W.C.; ANTONELLI, J.; TOMASSONI, F. Allelopathic influence of the aqueous extract of *Jatropha curcas* L. leaves on wild *Cichorium intybus*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 49, p. 6575-6578, 2013.

- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 2039-2057, 1998.
- EINHELLIG F.A. 2002. The physiology of allelochemical action: clues and views. **In:** REIGOSA M. J., PEDROL N. (eds) Allelopathy: from molecules to ecosystems. Science Publishers Inc., Enfield, USA.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.
- FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. **In:** KIGEL, L.; GALILI, G. (Eds.). **Seed Development and Germination**. New York, Marcel Dekker Inc, 1995.
- GATTI, A.B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S.C.J.G.A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2010.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.
- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Allelopathic interference of *Sapindus saponaria* root and mature leaf aqueous extracts on diaspore germination and seedling growth of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, p. 1-9, 2012.
- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C.; FORIM, M.R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, v. 31, p. 239-248, 2013a.
- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Influência alelopática do extrato aquoso de raiz de *Sapindus saponaria* L. sobre capim-arroz e corda-de-viola. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 760-766, 2013b.
- INDERJIT; CALLAWAY, R.M. Experimental designs for the study of allelopathy. **Plant and Soil**, v. 256, p. 1-11, 2003.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, n. 1, p. 28-44, 1995.
- INDERJIT; NIELSEN, E. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 221-238, 2003.
- INDERJIT; WESTON, L.A. Are laboratory bioassays for Allelopathy suitable for prediction of field responses? **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2111-2118, 2000.
- INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2014. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Agosto de 2014).

- KHANH, T.D.; CHUNG, I.M.; TAWATA, S.; XUAN, T.D. Weed suppression by *Passiflora edulis* and its potential allelochemicals. **Weed Research Society**, v. 46, p. 296-303, 2006.
- KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1-7, 2004.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, DC: OEA, 1983.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait). F. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48., p. 263-284, 1976.
- LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. Berlin, Springer-Verlag, 1995.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Rima Artes e Textos, Sao Carlos, 2004.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.
- MAGUIRE, J.D. Speed germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MARASCHIN-SILVA, F.E; ÁQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v. 30, p. 547-555, 2006.
- MENDES, C.E.; CASARIN, F.; SPERANDIO, S.L.; MOURA, N.F.; DENARDIN, R.B.N. Avaliação do potencial fitotóxico de *Persea venosa* Nees & Mart. (Lauraceae) sobre sementes e plântulas de diferentes espécies cultivadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 337-346, 2013.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, p. 401-406, 2004.
- PANNACCI, E.; PETTOROSSO, D.; TEI, F. Phytotoxic effects of aqueous extracts of sunflower on seed germination and growth of *Sinapis alba* L., *Triticum aestivum* L. and *Lolium multiflorum* Lam. **Allelopathy Journal**, v. 32, n. 1, p. 23-36, 2013.
- PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L.; REIGOSA, M.J. Allelopathy and abiotic stress. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Ed.). **Allelopathy**: a physiological process with ecological implications. Dordrecht: Springer, 2006. p. 171-209.
- PELEGRINI, D.D.; TSUZUKI, J.K.; AMADO, C.A.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.
- PENG, S.L.; CHEN, Z.Q.; WEN, J.; SHAO, H. Is allelopathy a driving force in forest succession? **Allelopathy Journal**, v. 14, p. 197-204, 2004.

- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 425-430, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.
- PINA, G.O.; BORGHETTI, F.; SILVEIRA, C.E.S.; PEREIRA L.A.R. Effects of *Eugenia dysenterica* leaf extracts on the growth of sesame and radish. **Allelopathy Journal**, v. 23, p. 313-322, 2009.
- PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. Allelopathy: State of the Science. Pp. 1-19. In: Putnam, A.R. & Tang, C.S. (eds.). **The science of allelopathy**. New York, John Wiley & Sons, 1986.
- RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p.577-608, 1999.
- REJILA, S.; VIJAYAKUMAR, N. Allelopathic effect of *Jatropha curcas* on selected intercropping plants (Green Chilli and Sesame). **Journal of Phytology**, v. 3, n. 5, p. 01-03, 2011.
- RICE, E.L. **Allelopathy**. USA, Academic press, 1984.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SING, V.K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: Rizvi SJH, Rizvi V (eds.). **Allelopathy. Basic and applied aspects**. Chapman and Hall Editors, London, pp. 1-10, 1992.
- SHUKLA, A.K.; PRASAD, S.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGH, S.P.; SINGH, R.P. Allelopathic effect of thatch grass (*Imperata cylindrica* L.) on various kharif and rabi season crops and weeds. **Indian Journal of Weed Science**, v. 35, p. 163-166, 2003.
- SILVA, R.N.; DUARTE, G.L.; LOPES, N.F.; MORAES, D.M.; PEREIRA, A.L.A. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 215-220, 2008.
- SINGH, S.P; BATISH, D.R; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R.K. a-Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annal of Botany**, v. 98, 1261-1269, 2006.
- SOARES, G.L.G.; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids.) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 180-197, 2000.
- SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; HAVLIK, J.; DAMME, P.V.) Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation**, v. 59, p. 227-236, 2009.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; DUARTE, M.L.R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, p. 227-230, 2007.

- SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
- SOUZA, F.M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S.C.J.G.A.; RODRIGUES, R.R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 1, p. 169-174, 2010.
- STOWE, L.G. Allelopathy and its influence on the distribution of plants in an Illinois old-field. **Journal of Ecology**, v. 67, p. 1065-1085, 1979.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.
- TANVEER, A.; REHMAN, A.; JAVAID, M.M.; ABBAS, R.N.; SIBTAIN, M.; AHMAD, A.U.H.; IBIN-I-ZAMIR, M.S.; CHAUDHARY, K.M.; AZIZ, A. Allelopathic potential of *Euphorbia helioscopia* L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, p. 75-81, 2010.
- TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 34, p. 1277-1285, 2012.
- TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, 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 and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.
- TUR, C.M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. **Biotemas**, n. 23, v. 2, p. 13-22, 2010.
- VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1957-1968, 1991.
- WEIDENHAMER, J.D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 866-875, 1996.
- WEIDENHAMER, J.D.; HARTNETT, D.C.; ROMEO, J.T. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal of Applied Ecology**, v. 26, p. 613-624, 1989.
- YOSHIMURA, H.; SAWA, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 320-328, 2011.
- ZHANG, Y.; GU, M.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. **Plant and Soil**, v. 327, p. 455-463, 2010.

## CAPÍTULO IV

### **Fitotoxicidade e identificação de metabólitos secundários do extrato foliar de *Sapindus saponaria* L.**

**RESUMO** - O objetivo desse estudo foi avaliar e quantificar o efeito fitotóxico das frações de hexano e acetato de etila obtidas do extrato foliar de *Sapindus saponaria* L. sobre a germinação de diásporos e crescimento de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.); assim como isolar e identificar os principais compostos bioativos. O extrato bruto etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol. O extrato foi fracionado por partição líquido-líquido, e as frações de hexano e acetato de etila foram solubilizadas nas concentrações 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Nos bioensaios comparou-se o efeito dessas frações com o herbicida oxifluorfem. As frações de hexano e acetato de etila inibiram a germinação, induziram o aparecimento de anormalidades e reduziram o crescimento das plântulas de *E. crus-galli* e *E. heterophylla*, com efeito dependente da concentração. A fitotoxicidade das frações variou de acordo com a espécie receptora, sendo que a fração acetato de etila apresentou efeito inibitório superior ao da fração hexânica sobre o desenvolvimento das plântulas. Para ambas as espécies, o herbicida oxifluorfem inibiu principalmente o crescimento da parte aérea; enquanto, os extratos vegetais o crescimento radicular das plântulas, sendo a necrose da raiz a principal anomalia identificada. As frações de *S. saponaria* reduziram em mais de 50% o tamanho das células do metaxilema das raízes de *E. heterophylla*. A fração acetato de etila obtida das folhas de *S. saponaria* foi submetida ao fracionamento e, a substância isolada foi identificada como ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo [2.1.1] hexan-2-il) but-2-enóico. Este composto também inibiu a germinação e o crescimento das plântulas de *E. crus-galli* e *E. heterophylla*, porém a fração acetato de etila foi mais potente em reduzir o crescimento das plântulas.

**Palavras-chave:** aleloquímicos, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*, Sapindaceae, terpeno.

**ABSTRACT** - (Identification of secondary metabolites and phytotoxicity of *Sapindus saponaria* L. leaf extract). The aim of this study was to evaluate and quantify the phytotoxic effects of hexane and ethyl acetate fractions obtained from a leaf extract of *Sapindus saponaria* L. on the germination and seedling growth of *Euphorbia heterophylla* L. (wild poinsettia) and *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (barnyardgrass) and to isolate and identify the major bioactive compounds. A crude ethanol extract was prepared from 100 g of dry plant material in 500 mL of ethanol. The extract was fractionated by liquid-liquid extraction, and the hexane and ethyl acetate fractions were solubilized at concentrations of 0.625, 1.25, 2.5 and 5.0 mg mL<sup>-1</sup>. The effect of these fractions was compared with the oxyfluorfen herbicide in bioassays. The hexane and ethyl acetate fractions inhibited germination, induced abnormalities, and reduced seedling growth of *E. crus-galli* and *E. heterophylla* with concentration-dependent effects. The phytotoxicity of the fractions ranged according to the receptor species, and the ethyl acetate fraction showed a greater inhibitory effect than the hexane fraction on seedling development. For both species, the oxyfluorfen herbicide inhibited mainly shoot growth, whereas the plant extracts inhibited seedling root growth. Root necrosis was the main abnormality identified. The *S. saponaria* fractions caused a reduction of more than 50% in the size of metaxylem cell of *E. heterophylla* root. The ethyl acetate fraction obtained from *S. saponaria* leaves was subjected to fractionation, and the substance isolated was identified as 3-(1,2-dimethyl-5-oxabicyclo [2.1.1] hexan-2-yl) but-2-enoic acid. This compound also inhibited the germination and seedling growth of *E. crus-galli* and *E. heterophylla*, but the ethyl acetate fraction was more potent in reducing seedling growth.

**Keywords:** allelochemicals, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*, Sapindaceae, terpene.

## 1. Introdução

Fitoquímicos bioativos liberados no ambiente podem exercer efeitos prejudiciais sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Sodaeizadeh et al., 2009). Há cada vez mais evidências que essas substâncias podem inibir a germinação e o crescimento de diferentes espécies daninhas (Tawaha e Turk 2003; Sampietro e Vattuone, 2006). *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Poaceae, capim-arroz) e *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae, amendoim-bravo) são plantas daninhas de ocorrência muito comum no Brasil e causadoras de grandes impactos em sistemas agrícolas (Aliotta, et al., 2006; Vidal et al., 2007). A principal ferramenta empregada no controle dessas espécies é o uso de herbicidas sintéticos, com consequente ocorrência de impactos ambientais e seleção de biótipos resistentes a algumas moléculas convencionalmente utilizadas (Batish et al., 2007; Hagemann et al., 2010; Grisi et al., 2013). O controle químico é o método mais amplamente empregado, em decorrência da sua alta eficiência e praticidade (Panozzo et al., 2014). No entanto, a intensa aplicação de agrotóxicos causa danos ambientais, atuando no balanço de microorganismos do solo e nas mudanças das propriedades físico-químicas do mesmo, resultando na diminuição da produtividade da colheita (Chou, 1999).

A incorporação de substâncias com atividade alelopática na agricultura pode reduzir essa poluição ambiental e aumentar a produção agrícola, visando o manejo sustentável (Parvez et al., 2003; He et al., 2004; Sodaeizadeh et al., 2009). As plantas são capazes de desenvolver mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de determinados metabólitos secundários, liberados no ambiente e que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta (Marco et al., 2012). O acúmulo de substâncias com efeitos alelopáticos tem sido verificado em todos os órgãos vegetais, havendo uma tendência de acúmulo nas folhas (Dorning e Cipollini, 2006; Khan et al., 2011); porém, os aleloquímicos podem variar quanto à composição, concentração e localização no vegetal (Hong et al., 2004). Os efeitos fitotóxicos são mediados por substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, glicosídeos, saponinas, taninos, entre outros (Wink, 2003; Silva et al., 2010).

Plantas da família Sapindaceae constituem a base da medicina popular oriental, principalmente devido à presença das saponinas (Sparg et al., 2004). Essas substâncias possuem atividades biológicas diversas como ação moluscicida, piscicida, anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica (Sparg et al., 2004; Tsuzuki et al., 2007) e propriedades reguladoras do crescimento de plantas (Ohara e Ohira, 2003). Uma das teorias mais aceita para explicar a alta concentração de saponinas em muitas espécies de plantas é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, sejam estes fungos, bactérias ou vírus (Sparg

et al., 2004). Além das saponinas, as principais classes de compostos encontrados no gênero *Sapindus* são flavonóides, triterpenos, esteróides e glicosídeos (Pelegri et al., 2008).

*Sapindus saponaria* L. (sabão-de-soldado, Sapindaceae) é uma árvore de porte médio distribuída por todos os trópicos e geralmente encontrada nas florestas pluvial e semidecídua (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006; Tsuzuki et al., 2007). As principais substâncias bioativas encontradas em seus frutos são saponinas e oligoglicosídeos de sesquiterpenos acíclicos (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006). Apesar das plantas de *S. saponaria* se destacarem por ser uma boa fonte de saponinas bioativas, há uma falta de estudos detalhados sobre a composição química dessa espécie (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006). Estudos anteriores mostraram que os extratos aquosos de folhas de *S. saponaria* apresentaram efeitos inibitórios sobre a germinação e crescimento de *E. crus-galli* e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnell (Grisi et al., 2012), podendo ser uma planta promissora na busca de fitoquímicos capazes de atuar como herbicidas naturais.

Nesse contexto, a investigação das propriedades fitotóxicas de *S. saponaria* podem representar uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas e compostos ativos com empregabilidade na agricultura, podendo ser utilizadas como reguladores ou inibidores do crescimento de plantas daninhas. Assim, o presente estudo teve como objetivo (1) avaliar e quantificar o efeito fitotóxico das frações de hexano e acetato de etila obtidas do extrato etanólico foliar de *S. saponaria* sobre a germinação dos diásporos e crescimento de plântulas de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-arroz (*E. crus-galli*); (2) isolar e identificar os principais compostos bioativos; e (3) examinar a fitotoxicidade do composto isolado em comparação com a sua mistura derivada.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Preparação das frações**

Folhas maduras (coloração verde-escura e textura coriácea) de *S. saponaria* foram coletadas no município de São Carlos-SP (22°02' S e 47° 52' W), em maio de 2011. A região é caracterizada pelo tipo climático Aw (Köppen, 1948), com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, durante 72 h, e trituradas em moinho industrial.

O extrato etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol e, submetido à exaustiva extração etanólica, no escuro e a frio, durante 72 h. Após esse período, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida,

obtendo-se o extrato bruto etanólico. O extrato bruto (60g) foi suspenso em metanol (MeOH) e água deionizada na proporção 1:3 (v/v), resultando na fase aquosa. Essa solução foi fracionada por partição líquido-líquido utilizando hexano, acetato de etila (AcOEt) e butanol, em ordem cronológica. As soluções obtidas foram evaporadas sob pressão reduzida produzindo as frações hexânica (22,27 g), AcOEt (8,43 g), butanólica (10,92 g) e aquosa (11,34 g). Cada fração foi submetida ao bioensaio com coleóptilos de trigo. As frações de hexano e AcOEt, que apresentaram maior atividade inibitória, foram solubilizadas em solução tampão (10 mM de ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH, pH = 6) e DMSO (dimetil sulfoxido, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) nas concentrações 5,0; 2,5; 1,25; 0,625  $\text{mg mL}^{-1}$ . Nos testes de germinação e crescimento de plântulas utilizou-se como controle negativo a solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) e, como controle positivo o herbicida comercial oxifluorfem (240 g.i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) nas doses 1,0 e 2,0  $\text{L ha}^{-1}$ . Oxifluorfem é um herbicida de ação seletiva, não sistêmico e indicado para o controle de plantas daninhas, mono e eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Rodrigues e Almeida, 2011).

## 2.2. Bioensaio de germinação

As quatro concentrações das frações de hexano e AcOEt provenientes do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* foram aplicadas nos diásporos de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). O bioensaio foi conduzido em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL das frações, herbicida ou solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 30 diásporos. O experimento foi instalado em estufa B.O.D. a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h luz (Inoue et al., 2010). As leituras foram realizadas a cada 12 h, durante os sete primeiros dias, e em intervalos de 24 h, até a estabilização da germinação, adotando-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação. Foram avaliadas a germinabilidade ( $G$ ), a velocidade de germinação de Maguire ( $VG$ ), o tempo ( $\bar{t}$ ) e a velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ) (Ranal e Santana, 2006).

## 2.3. Bioensaio de crescimento de plântulas

Na análise de crescimento de plântulas de amendoim-bravo e capim-arroz, as unidades de dispersão foram previamente germinadas em água destilada. Plântulas com 3 mm de raiz primária foram transferidas para caixas de plástico transparente (13 x 8 x 3 cm), contendo como substrato duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL das frações, herbicida ou solução tampão e

DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), nas mesmas concentrações adotadas para o teste de germinação. As caixas foram tampadas e mantidas em B.O.D. a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Foram utilizadas quatro repetições de 10 plântulas, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após sete dias do transplante, foram medidos os comprimentos da parte aérea e raiz primária e avaliadas as anomalias das plântulas.

As plântulas foram classificadas em normais e anormais, de acordo com as especificações de Brasil (2009), sendo consideradas anormais aquelas que não mostraram potencial para continuar o seu desenvolvimento. Para as plântulas anormais de amendoim-bravo foi possível quantificar as principais anomalias provocadas pelas frações e pelo herbicida.

#### **2.4. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema)**

Plântulas de amendoim-bravo cresceram em soluções do controle negativo e das frações de hexano e AcOEt das folhas de *S. saponaria*, nas mesmas condições citadas para o bioensaio de crescimento. Decorrido quatro dias, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, o segmento da raiz primária foi removido e imerso em álcool 70% (Gatti et al., 2010). A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997), em que as raízes ficaram imersas em álcool (70%), durante cinco dias, e depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25%) a 60 °C, durante 48 h, período em que foi observado a clarificação do material.

Em seguida, o material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{C}_1$ ) e soda cáustica (NaOH a 10%), e transferido para estufa, a 60 °C, por 24 h. Após a coloração, a raiz foi fixada em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Utilizaram-se quatro repetições de raízes primárias crescidas em diferentes concentrações das frações e no controle. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, da região central em direção ao colo (Gatti et al., 2010), no aumento de 20 vezes. A partir dessas fotos, foram medidas até 15 células centrais do metaxilema, utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0.

#### **2.5. Fracionamento e identificação dos metabólitos secundários**

A fração AcOEt (3,0 g), selecionada a partir dos resultados obtidos pelos bioensaios de germinação e crescimento, foi suspensa com metanol (MeOH) e água deionizada na proporção 1:3 (v/v). Essa solução foi fracionada por partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e AcOEt, em ordem crescente de polaridade. As soluções foram

evaporadas sob pressão reduzida, produzindo as frações de hexano (89,7 mg), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (577,2 mg), AcOEt (624,4 mg) e hidroalcoólica (964,8 mg) (Figura 1).

Após análise por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), as frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e AcOEt foram reunidas e submetidas a um novo fracionamento em coluna cromatográfica contendo sílica gel (230-400 mesh), em misturas de hexano/acetona de polaridade crescente, seguido de metanol. Esse procedimento rendeu um total de 41 sub-frações, que foram monitoradas pela CCDA (Figura 1). De acordo com as observações em CCDA, as sub-frações F19 (hexano/acetona 7:3; 3,2 mg), F20 (hexano/acetona 6:4; 3,9 mg), F21 (hexano/acetona 6:4; 54,3 mg), F22 (hexano/acetona 6:4; 5,1 mg), F23 (hexano/acetona 1:1; 3,0 mg) e F24 (hexano/acetona 1:1; 3,4 mg) foram reunidas e submetidas às análises por Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D (Bruker 600 MHz, 14,1 T) e Espectrometria de Massas Sequencial (ABSciex API 2000 Applied) para identificação das substâncias purificadas.

A fim de analisar o composto por LC-MS/MS, a amostra foi solubilizada em água/acetonitrila (1:1) na concentração de 650 µg mL<sup>-1</sup>. Esta solução foi diluída para 32,5 µg mL<sup>-1</sup> e, em seguida, a amostra foi analisada por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) utilizando o sistema LC Agilent 1290 (Agilent Technologies, EUA). A análise foi realizada no modo gradiente de fase reversa, utilizando o Zorbax Extend-C18 (1,8 µm, 2,1x50 mm) e uma fase móvel constituída de acetonitrila (fase B) e TFA a 0,1% (v/v). O programa estabelecido para as condições de gradiente foi: 0-1 min: 50% fase B; 1-2 min: 90% fase B; 2-5 min: 90% fase B. A taxa de fluxo era de 0,5 mL min<sup>-1</sup> a 25 °C, e o volume injetado foi de 2 µL. A aquisição foi realizada em Agilent ifunnel Q-TOF-MS 6550 LC-MS com fonte dupla Agilent Jet Stream ESI (Dual AJS-ESI) nas seguintes condições: gás de secagem a 280 °C, fluxo do gás de secagem a 14 L min<sup>-1</sup>, nebulizador a 20 psi; bainha de gás a 350 °C; bainha de gás flua 12 L min<sup>-1</sup>, VCap 2500; bico de tensão 0 V, Fragmentor 110 V, 01 de outubro RF Vpp 750 V, e energia de colisão de 20 V usando N<sub>2</sub>. A aquisição dos espectros de massas variou entre 50 e 220 m/z.

O composto isolado foi também submetido aos bioensaios de germinação e crescimento de plântulas com *E. heterophylla* e *E. crus-galli*, nas mesmas condições descritas acima. O composto foi solubilizado em uma solução tampão e DMSO (5 µL mL<sup>-1</sup>) nas concentrações de 1 mM, 300 µM, 100 µM, 30 µM e 10 µM. Esse bioensaio de germinação foi realizado em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel de filtro umedecida com 1,5 mL da solução controle e do composto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 20 diásporos.

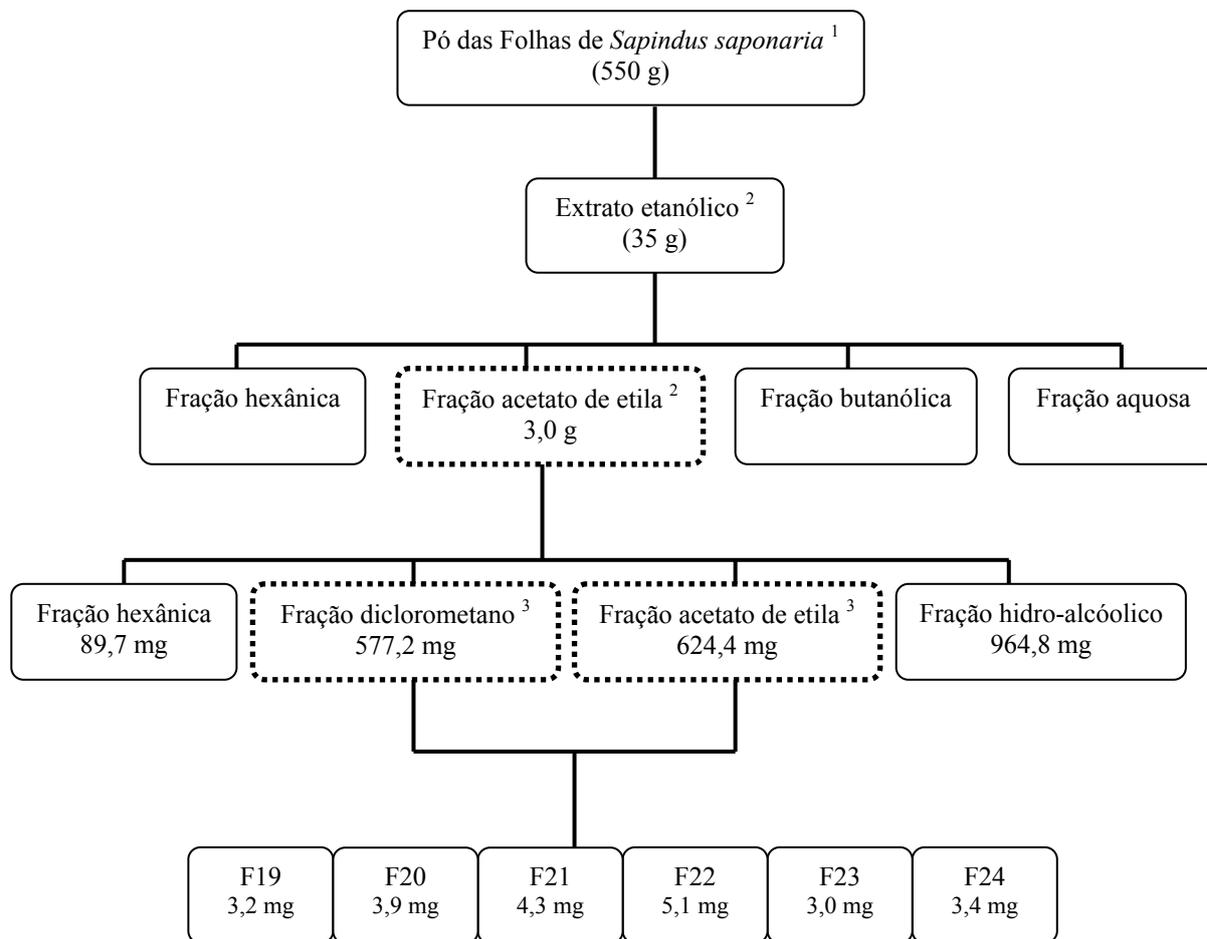


Figura 1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados a partir do pó das folhas de *S. saponaria*, com os respectivos rendimentos. <sup>1</sup>Extração etanólica. <sup>2</sup>Partição líquido-líquido. <sup>3</sup>Cromatografia de coluna (sílica gel).

## 2.6. Análise estatística

Os dados obtidos para cada uma das características avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando essas duas pressuposições foram atendidas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Procedeu-se à regressão linear ou quadrática, quando o resultado da ANOVA foi significativo. A qualidade do ajuste dos modelos foi aferida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os dados foram submetidos à análise conjunta uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes, 1990).

### 3. Resultados

A fração hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* inibiu significativamente o processo de germinação e o crescimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo. Para o capim-arroz, a fração hexânica promoveu acréscimo linear de 1,77 h no tempo médio de germinação e decréscimo linear de 0,0004 h<sup>-1</sup> na velocidade média de germinação para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de solução adicionada; enquanto, a germinabilidade (60,60%) e velocidade de germinação de Maguire (0,2602 cariopses h<sup>-1</sup>) atingiram seus valores mínimos nas concentrações estimadas de 3,46 e 3,96 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2). As sementes de amendoim-bravo apresentaram valores mínimos de germinabilidade (45,63%), velocidade média (0,0182 h<sup>-1</sup>) e velocidade de germinação de Maguire (0,2911 sementes h<sup>-1</sup>) nas concentrações estimadas de 4,13; 3,7 e 3,91 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, o tempo médio de germinação atingiu seu valor máximo (55,55 h) na concentração de 3,95 mg mL<sup>-1</sup> da fração hexânica (Figura 2). As plântulas de capim-arroz submetidas aos efeitos da fração hexânica apresentaram menores comprimentos da parte aérea (24,73 mm) e da raiz (10,31 mm) nas concentrações 3,62 e 3,85 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3a). Entretanto, o comprimento da parte aérea (34,12 mm) e da raiz (15,09 mm) das plântulas de amendoim-bravo foi mínimo nas concentrações estimadas de 3,68 e 3,87 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3b).

A fração AcOEt oriunda das folhas de *S. saponaria* também exerceu efeito fitotóxico no processo de germinação dos diásporos das espécies daninhas estudadas. Para o capim-arroz, observaram-se valores mínimos na germinabilidade (60,90%) e na velocidade de germinação de Maguire (0,2465 sementes h<sup>-1</sup>) nas concentrações estimadas de 3,42 e 3,88 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente; enquanto o tempo e a velocidade média de germinação apresentaram aumento e decréscimo linear de 2,90 h e 0,0006 h<sup>-1</sup>, respectivamente, para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de solução adicionada (Figura 4). A fração AcOEt reduziu linearmente a germinabilidade e a velocidade média de germinação das sementes de amendoim-bravo (1,59% e 0,0012 h<sup>-1</sup> para cada adição de 1 mg mL<sup>-1</sup> de solução); e, em contrapartida, promoveu o aumento linear no tempo médio de germinação (3,27 h para cada 1 mg mL<sup>-1</sup> de solução adicionada). Na concentração 4,24 mg mL<sup>-1</sup> da fração a AcOEt, registrou-se a menor velocidade de germinação de Maguire (0,2856 sementes h<sup>-1</sup>) para as sementes de amendoim-bravo (Figura 4), indicando que os aleloquímicos também tem o potencial de reduzir o vigor dessas sementes.

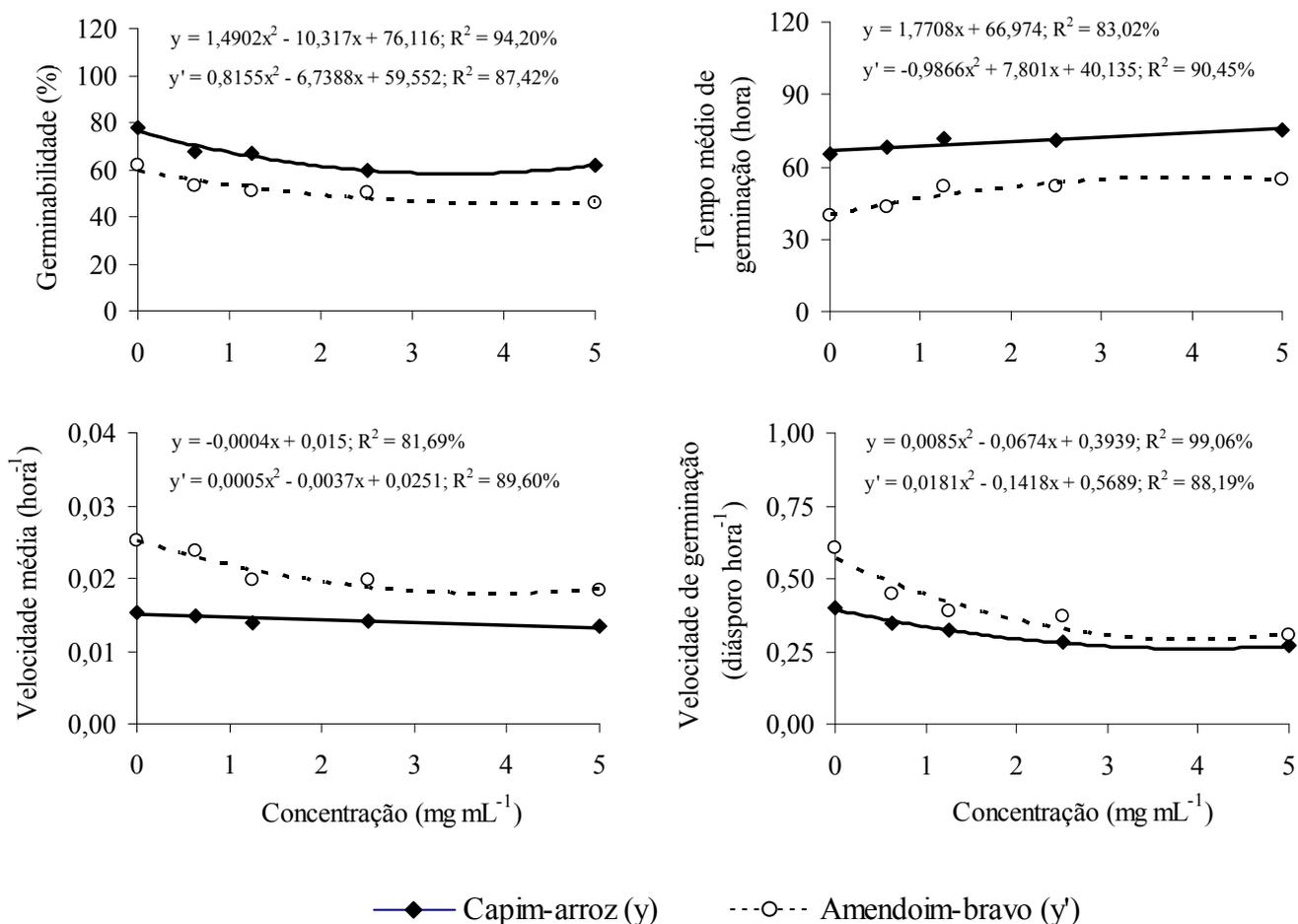


Figura 2. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média e velocidade de germinação de Maguire dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo submetidos à ação da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

No bioensaio de crescimento, os menores valores de comprimento da parte aérea das plântulas de capim-arroz (36,31 mm) e amendoim-bravo (33,64 mm), crescidas na solução contendo a fração AcOEt, foram registrados nas concentrações 4,32 e 3,75 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5). As plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo apresentaram valores nulos (0 mm) para o comprimento da raiz, nas concentrações estimadas de 3,31 e 3,53 mg mL<sup>-1</sup> da fração AcOEt, respectivamente (Figura 5). Para ambas as espécies, o maior efeito inibitório registrado pelas frações de hexano e AcOEt ocorreu no sistema radicular.

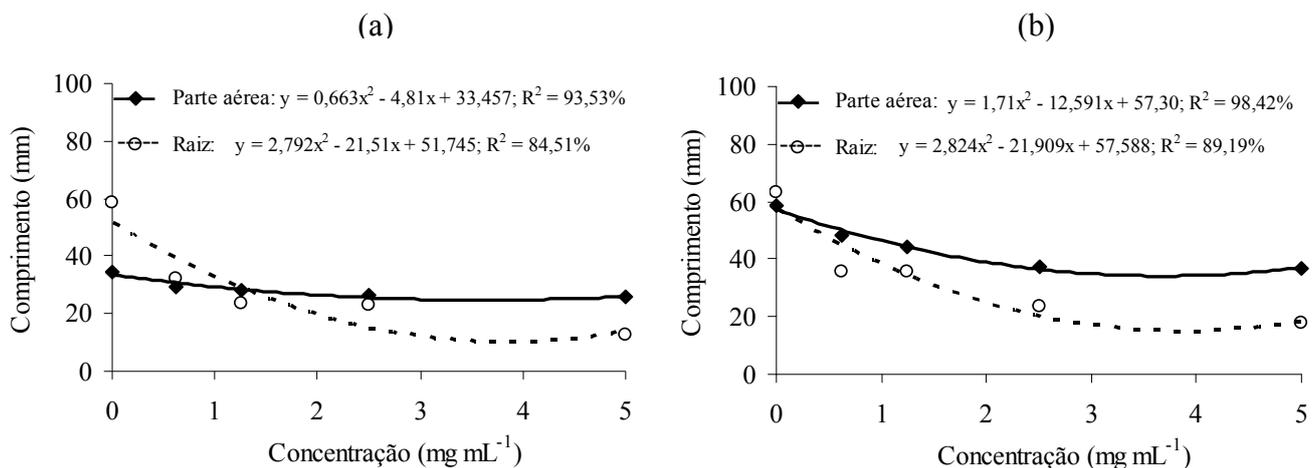


Figura 3. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

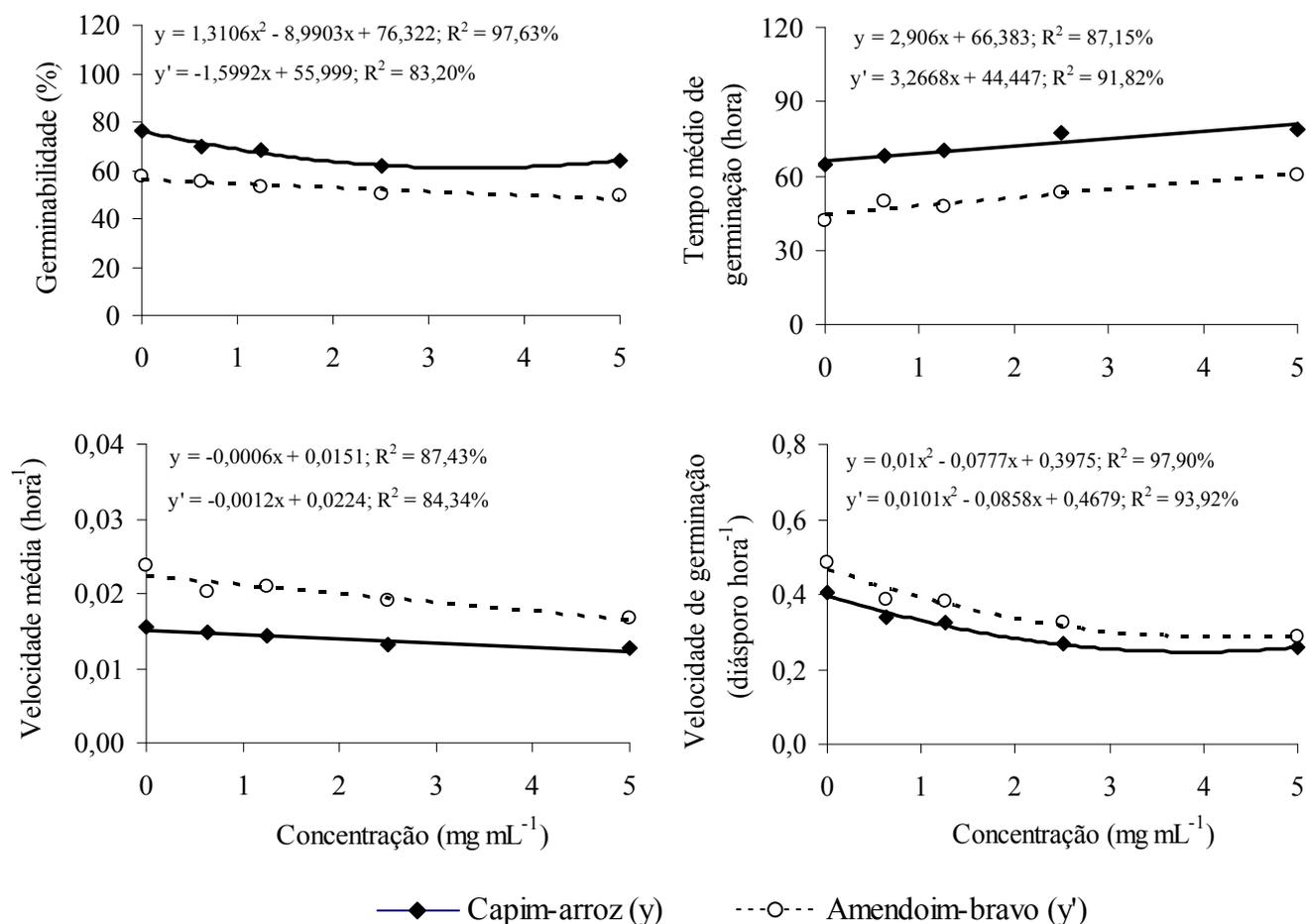


Figura 4. Germinabilidade, tempo médio, velocidade média e velocidade de germinação de Maguire dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo submetidos à ação da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

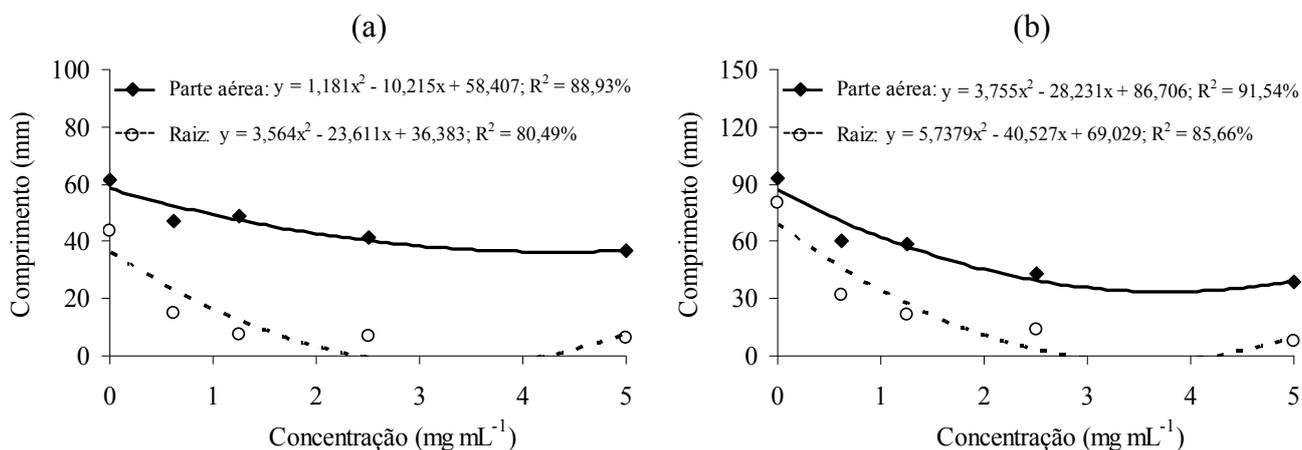


Figura 5. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

A porcentagem máxima de plântulas anormais de capim-arroz foi registrada nas concentrações estimadas de 3,95 (55,78%) e 4,25 mg mL<sup>-1</sup> (69,21%) das frações de hexano e AcOEt, respectivamente (Figura 6a). As plântulas de amendoim-bravo foram mais sensíveis aos efeitos das frações, sendo que a maior ocorrência de plântulas anormais foi verificada nas concentrações 3,56 (73,80%) e 4,24 mg mL<sup>-1</sup> (92,96%) das frações de hexano e AcOEt, respectivamente (Figura 6b). Para ambas as espécies, a fração AcOEt registrou maior porcentagem de plântulas anormais quando comparada com a fração hexânica (Tabela 1). O tratamento com herbicida foi o mais eficiente no controle dessas espécies daninhas, com maior ocorrência de plântulas anormais; no entanto, a fração AcOEt também teve efeito similar ao do herbicida sobre as plântulas de amendoim-bravo (Tabela 1). As anomalias observadas para as plântulas anormais de capim-arroz e amendoim-bravo encontram-se na Tabela 1 e Figura 7.

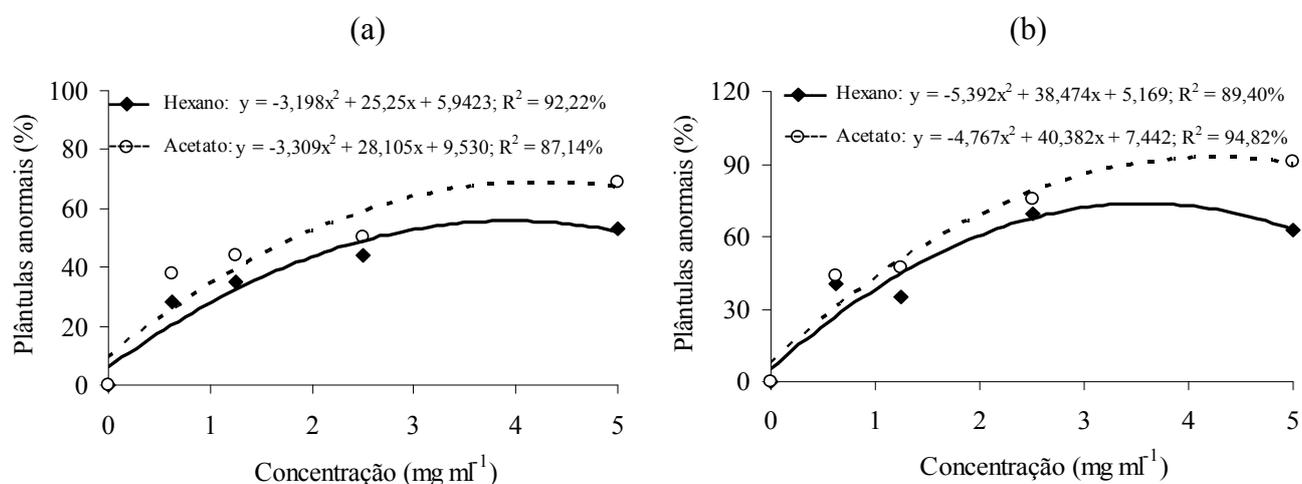


Figura 6. Plântulas anormais de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b) submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

Tabela 1. Plântulas anormais de capim-arroz e amendoim-bravo submetidas à ação do herbicida e das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* e, suas principais anomalias.

Tratamentos	Plântulas anormais (%)	Anomalias
Capim-arroz		
Hexano	40,06 b	Raiz (atrofiada, curta e necrosada) Parte aérea (curta, retorcida, deteriorada e ausente)
Acetato de etila	50,31 ab	
Herbicida	58,75 a	
Amendoim-bravo		
Hexano	56,53 b	Raiz (atrofiada, curta, necrosada, com geotropismo negativo, raízes laterais ausentes e desenvolvimento precoce das raízes secundárias) Parte aérea (curta, curvada, retorcida, deteriorada e com inversão gravitópica)
Acetato de etila	69,53 a	
Herbicida	71,87 a	

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

Raiz necrosada e hipocótilo retorcido ou curvado foram as principais anomalias identificadas nas plântulas anormais de amendoim-bravo crescidas nas soluções contendo as frações orgânicas. Entretanto, para o herbicida, a ausência de raízes laterais e hipocótilo retorcido ou curvado predominaram sobre as demais anormalidades (Figura 8). A porcentagem de plântulas anormais com hipocótilo retorcido ou curvado e inversão gravitópica foi a mesma para todos os tratamentos. A ocorrência de plântulas com raiz necrosada foi significativamente maior para as frações orgânicas do que para o herbicida. No entanto, a proporção de plântulas anormais de amendoim-bravo com raízes laterais ausentes foi maior no tratamento com o herbicida, seguido das frações AcOEt e hexano (Figura 8). As anormalidades encontradas nas plântulas de capim-arroz apresentaram características semelhantes em todos os tratamentos, sendo a necrose da raiz a principal anomalia identificada.

Considerando que o amendoim-bravo foi a espécie-alvo mais sensível, o estudo anatômico de suas raízes permitiu uma melhor visualização do modo de ação das diferentes frações em nível celular. O tamanho médio das células do metaxilema das plântulas crescidas no controle foi de 400,25  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  9,76). No entanto, as frações de *S. saponaria* reduziram em mais de 50% o tamanho das células do metaxilema da raiz (Hexano: 278,27-123,25  $\mu\text{m}$ , AcOEt: 182,51-80,88  $\mu\text{m}$ ) (Figuras 9 e 10). O tamanho das células do metaxilema das raízes das plântulas de amendoim-bravo crescidas sob a influência das frações de hexano e AcOEt foi inversamente proporcional à concentração das frações (Figura 9). Para todas as concentrações testadas, a fração AcOEt apresentou efeito inibitório maior do que a fração hexânica sobre o alongamento das células do metaxilema, com o tamanho mínimo de 80,88  $\mu\text{m}$  na concentração de 5,0  $\text{mg mL}^{-1}$  (Figuras 9 e 10).

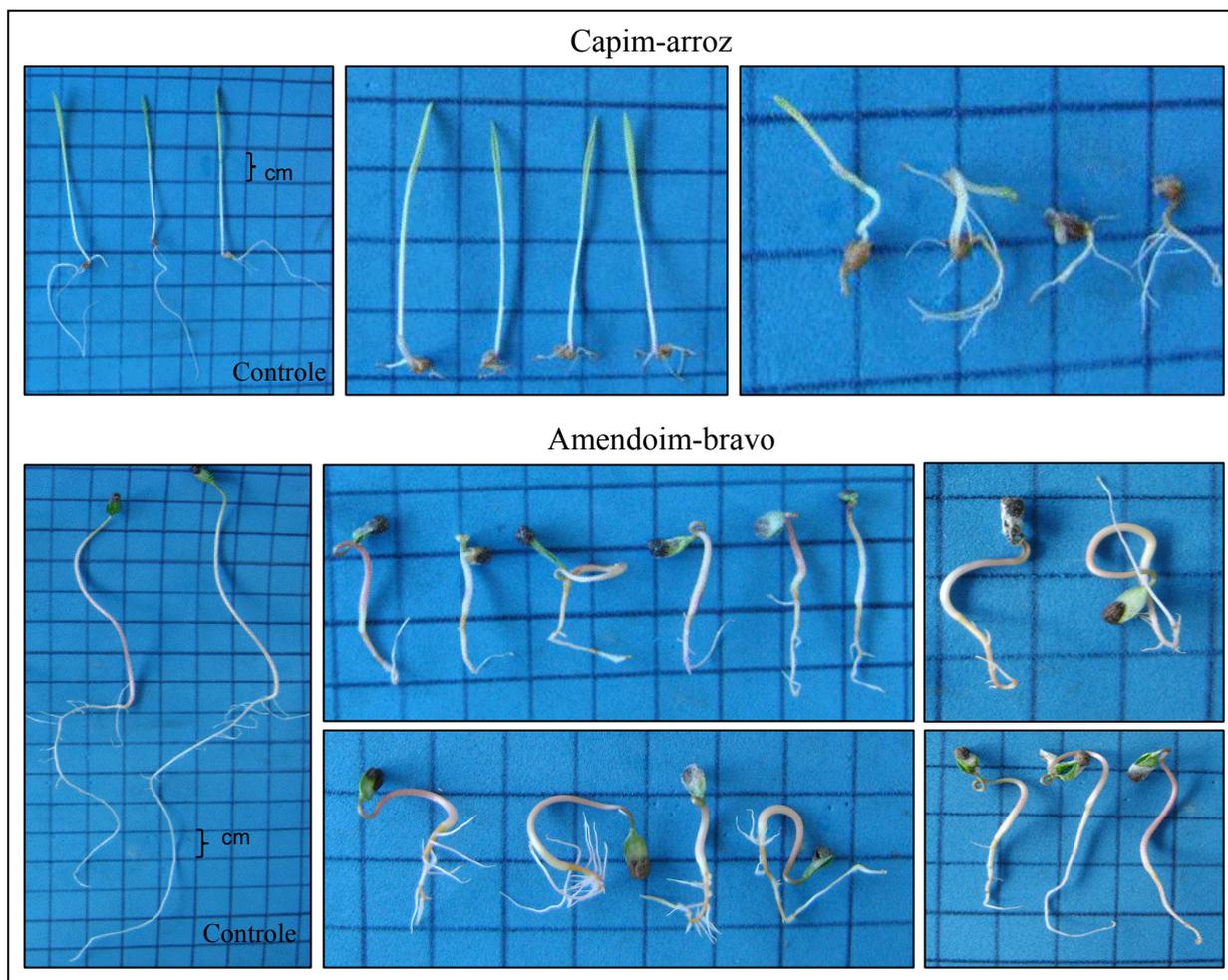


Figura 7. Anormalidades identificadas nas plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*. Escala = 1,0 cm.

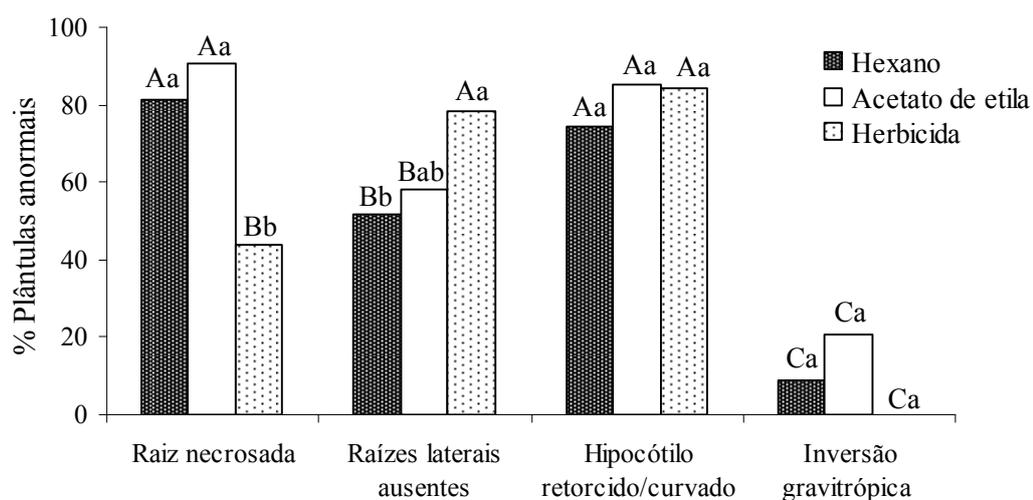


Figura 8. Principais anomalias encontradas nas plântulas anormais de amendoim-bravo submetidas à ação do herbicida e das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as anomalias e minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

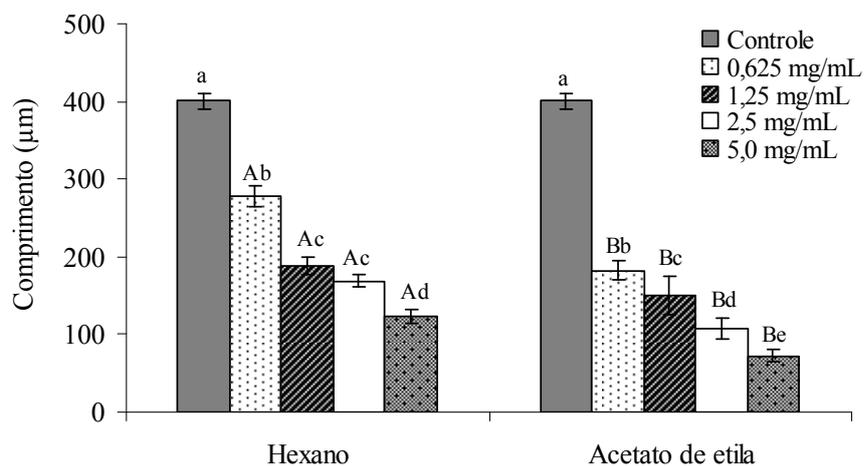


Figura 9. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para frações e minúsculas para as concentrações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão.

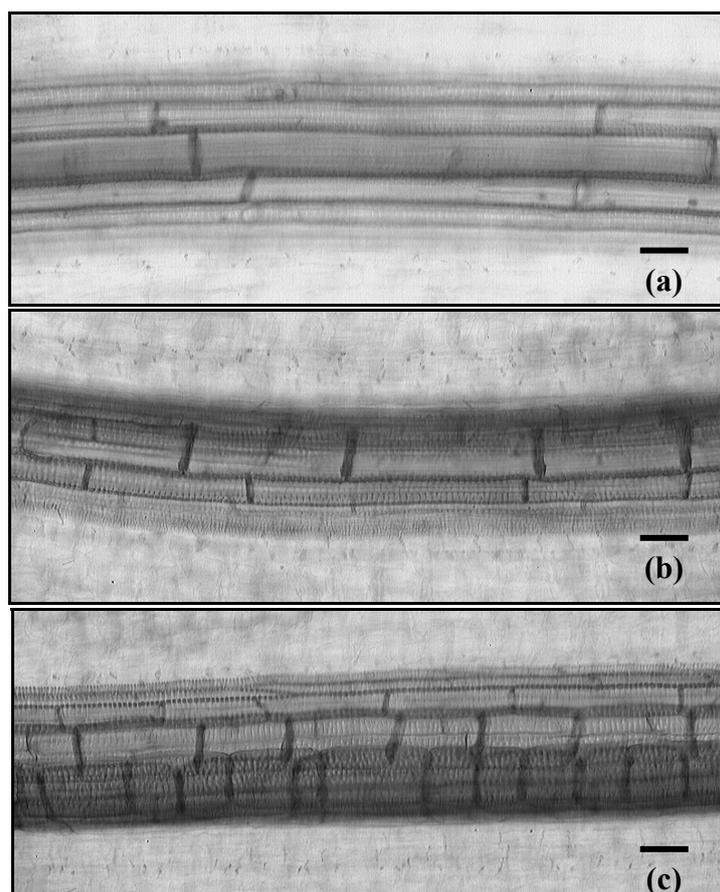


Figura 10. Fotomicrografia das células do metaxilema da raiz de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação do controle (a) e das frações de hexano (b) e acetato de etila (c) de folhas de *Sapindus saponaria* na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Escala =  $50 \mu\text{m}$ .

Comparando o efeito das diferentes frações obtidas das folhas de *S. saponaria* com o herbicida oxifluorfem, verificou-se que a porcentagem de inibição (em relação ao controle) sobre a germinabilidade das cariopses de capim-arroz foi a mesma para todos os tratamentos (Figura 12a). Para o amendoim-bravo, o herbicida (28,95%), seguido da fração hexânica (18,92%) exerceram maior efeito inibitório sobre a germinação dessas sementes (Figura 12b). Para ambas as espécies daninhas, o alongamento da parte aérea foi mais afetado pelo herbicida, seguido pela fração AcOEt. Analisando o comprimento radicular, a fração hexânica teve efeito inibitório similar ao do herbicida, enquanto que a fração AcOEt apresentou inibição superior a esses tratamentos sobre esse órgão (Figura 12). Assim, pode-se dizer que dentre as frações estudadas, a fração AcOEt apresentou maior efeito inibitório sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo.

Com base nesses resultados, a fração AcOEt obtida das folhas de *S. saponaria* foi submetida ao fracionamento cromatográfico para purificação e identificação dos compostos presentes. Através de métodos fitoquímicos clássicos de separação por cromatografia foi possível obter as sub-frações (19-24) com pureza significativa para a caracterização estrutural por RMN 1D e 2D. Os dados espectroscópicos indicaram a presença do metabólito secundário denominado ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, sendo este pertencente a classe dos terpenos (Figura 11).

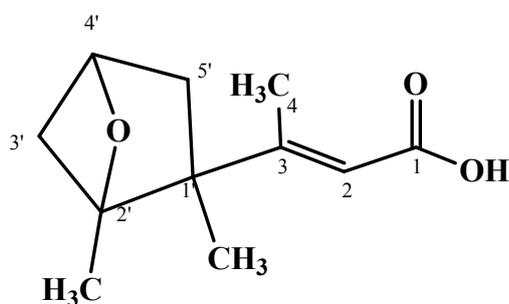


Figura 11. Estrutura química do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico isolado e identificado da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*.

A estrutura do metabólito isolado indica ser um ácido monoterpeneo com características espectroscópicas não conhecidas na literatura. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) apresentou três singletos em  $\delta$  1.472 (C-6', 3H), 1.274 (C-7', 3H) e 1.786 (C-4, 3H) referente às metilas, um singlete largo em  $\delta$  5.690 (C-2, 1H) que corresponde ao hidrogênio etileno alfa para uma carbonila alfa-beta insaturada, dois duplos dubletos em  $\delta$  1.532 (C-3'; 14,0, 4,0 Hz, 1H) e 1,780 (C-5'; 14,0, 4,0 Hz, 1H), dois duplos tripletos em  $\delta$  1.980 (C-3'; 14,0, 2,4 Hz, 1H) e 2.460 (C-5'; 14,0, 2,4 Hz, 1H) correspondentes a dois carbonos metilenos do ciclopentano, e um

multiplete referente ao hidrogênio carbinólico em  $\delta$ 4.331 (C-4'; m, 1H). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto apresentou sinais em  $\delta$ 182,6 (C-1), 112,0 (C-2), 172,0 (C-3), 26,9 (C-4), 35,9 (C-1'), 86,7 (C-2'), 47,3 (C-3'), 66,8 (C-4'), 45,6 (C-5'), 26,4 (C-6') e 30,6 (C-7'). A análise dos espectros de RMN 1D e 2D estão resumidas na tabela 1S e figuras 1S-5S. Considerando o número de carbono, hidrogênio e oxigênio proposto para a molécula, é possível obter a fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ , com uma massa molecular de  $196 \text{ g mol}^{-1}$  e índice de insaturação 4. O íon  $m/z$  197,1165, correspondente ao íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e identificado pela análise de *full scan*, foi confirmado pela espectrometria de massa de alta resolução (Figura 6S). A estrutura proposta foi confirmada pela análise dos íons obtidos por espectrometria de massa sequencial (MS/MS, Figura 7S). A análise do íon produto  $m/z$  197.1165, confirmou os íons  $m/z$  179.1057, 161.0950, 133.1002 e 107.0850 como sendo derivados do respectivo íon molecular (Figura 7S).

Tabela 2. Efeito do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, isolado a partir da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*, sobre a germinação e crescimento de plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo.

Concentração (M)	Germinação (%)	Comprimento (mm)	
		Parte aérea	Raiz
Capim-arroz			
Controle	$68.75 \pm 2.50$ a	$29.25 \pm 2.48$ a	$43.94 \pm 5.09$ a
$10^{-5}$	$51.25 \pm 5.50$ ab	$24.50 \pm 6.06$ ab	$27.75 \pm 8.83$ b

$3.10^{-5}$	$47.50 \pm 5.50$ ab	$22.03 \pm 1.11$ ab	$21.68 \pm 3.58$ bc
$10^{-4}$	$43.75 \pm 6.57$ b	$22.75 \pm 0.37$ ab	$19.27 \pm 1.11$ bc
$3.10^{-4}$	$45.00 \pm 6.12$ b	$19.50 \pm 5.82$ b	$18.04 \pm 4.44$ bc
$10^{-3}$	$45.00 \pm 3.53$ b	$16.98 \pm 1.78$ b	$14.55 \pm 1.19$ c

Amendoim-bravo			
Controle	$65.00 \pm 4.08$ a	$51.33 \pm 2.49$ a	$62.56 \pm 2.21$ a
$10^{-5}$	$60.00 \pm 4.08$ ab	$44.32 \pm 2.28$ ab	$50.97 \pm 1.78$ b
$3.10^{-5}$	$56.25 \pm 4.73$ ab	$43.35 \pm 10.21$ ab	$50.01 \pm 2.44$ b
$10^{-4}$	$55.00 \pm 4.08$ bc	$42.73 \pm 1.78$ ab	$44.59 \pm 2.89$ c
$3.10^{-4}$	$57.50 \pm 3.23$ ab	$42.40 \pm 4.73$ ab	$44.51 \pm 0.92$ c
$10^{-3}$	$46.25 \pm 2.39$ c	$38.80 \pm 2.14$ c	$43.97 \pm 1.13$ c

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelos testes de Tukey a 0,05 de probabilidade.

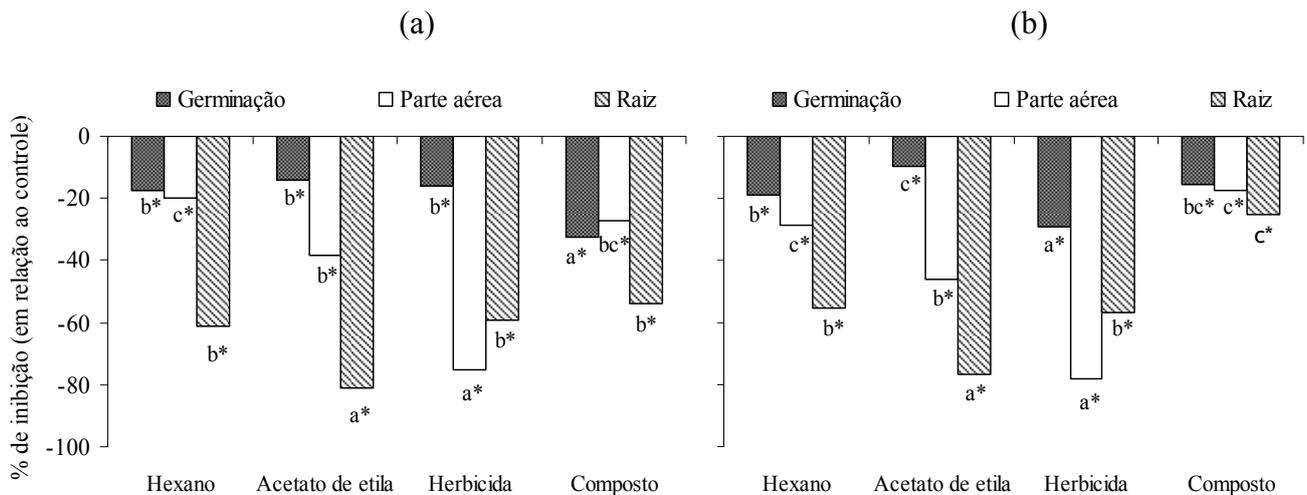


Figura 12. Efeito inibitório das frações de hexano e acetato de etila, do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico (composto isolado) obtidos das folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida sobre a germinação e crescimento das plântulas de capim-arroz (a) e amendoim-bravo (b). Médias seguidas por letras iguais nos tratamentos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. (\*) Diferença significativa em relação ao controle.

O ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico inibiu a germinação dos diásporos e o crescimento das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo, com efeito dependente da concentração e atuando, principalmente, no crescimento das raízes (Tabela 2). Esse composto exerceu forte efeito inibitório sobre a germinação das cariopses de capim-arroz com inibição

superior (32%) ao do herbicida (16%) e das frações de hexano (17%) e AcOEt (14%). A germinação das sementes de amendoim-bravo também foi afetada por esse composto (15%), apresentando inibição superior ao da fração AcOEt (9,8%). O composto isolado (54%) inibiu o crescimento da raiz de capim-arroz com efeito similar ao do herbicida (59%) e da fração hexânica (61%). Porém, o tratamento utilizando-se o ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico foi o que menos afetou o crescimento das plântulas de amendoim-bravo (Figura 12).

#### 4. Discussão

As frações de hexano e AcOEt obtidas do extrato etanólico foliar de *S. saponaria* foram fitotóxicas e, inibiram a germinação, reduziram o crescimento e induziram o aparecimento de anormalidades nas plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo. Para todos os parâmetros avaliados, a fitotoxicidade variou de acordo com a espécie receptora e o efeito inibitório foi dependente da concentração. Vários estudos mostram que o efeito negativo das substâncias químicas sobre as plantas daninhas é dependente da espécie (Prati e Bossdorf, 2004; Xuan et al., 2005; Sodaiezhadeh et al., 2009). Segundo Kobayashi (2004), a susceptibilidade das espécies alvo pelas substâncias fitotóxicas, sob condições de laboratório, depende das características fisiológicas e bioquímicas de cada espécie.

O efeito das frações orgânicas de *S. saponaria* no processo de germinação mostrou que os aleloquímicos podem atuar não só na germinabilidade, mas também na velocidade de germinação e no vigor dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo. O tempo médio de germinação é um fator importante para a sobrevivência das plantas daninhas, uma vez que plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido, menor competição por recursos e menos chance de estabelecimento no ambiente (Souza et al., 2010; Grisi et al., 2013). No entanto, essas frações exerceram maior efeito inibitório sobre o crescimento das plântulas, do que no processo de germinação desses diásporos; sendo que as principais reduções e alterações morfológicas foram registradas no crescimento da raiz. Esses resultados estão de acordo com outros autores, na qual relataram o forte efeito fitotóxico dos aleloquímicos sobre o crescimento das plântulas de espécies alvo (Sodaiezhadeh et al., 2009; Ashrafi et al., 2009; Souza et al., 2010; Grisi et al., 2012). As medidas analisadas nos bioensaios de germinação e crescimento de plântulas (variáveis dependentes) estabeleceram uma relação de causa e efeito com as concentrações das frações testadas (variável independente). Dessa maneira, é possível prever valores para estas características, em qualquer concentração das frações, dentro dos intervalos estudados (0 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup>).

No presente estudo, o alongamento da parte aérea das plântulas de capim-arroz e amendoim-bravo foi mais afetado pelo herbicida sintético. No entanto, as frações de hexano e AcOEt apresentaram, respectivamente, inibição similar e superior ao do herbicida para o comprimento radicular. Os dados obtidos indicam que o crescimento radicular de ambas as espécies foi mais responsivo do que o crescimento da parte aérea para a atividade fitotóxica inibitória induzida pelas frações. De acordo com Grisi et al. (2013), pode-se dizer que o herbicida oxifluorfem atua com mais intensidade na parte aérea; enquanto, os extratos vegetais investem na inibição radicular das plântulas. A avaliação de anormalidades das plântulas é também um parâmetro importante na detecção dos efeitos fitotóxicos. As principais anomalias identificadas para as espécies daninhas estudadas foram necrose radicular, hipocótilo retorcido ou curvado, ausência de raízes laterais, plântulas atrofiadas e inversão gravitrópica. Os resultados desse trabalho estão de acordo com Ferreira e Áquila (2000), que relataram que os aleloquímicos podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, na qual a necrose é o sintoma mais comum do efeito fitotóxico, inibindo o desenvolvimento da planta receptora. Entretanto, essa não foi a principal anomalia encontrada nas plântulas de amendoim-bravo tratadas com o herbicida, sendo que a ausência de raízes laterais e o hipocótilo retorcido ou curvado predominaram sobre essa anormalidade.

A sensibilidade radicular aos aleloquímicos é bem documentada na literatura, sendo uma das características que melhor indica a ação alelopática de extratos vegetais (Wandscheer e Pastorini, 2008; Souza et al., 2010; Inoue et al., 2010; Grisi et al., 2012). Isso pode ser atribuído pelo fato da raiz ser o primeiro órgão a emergir e estar em contato direto com os extratos; dessa maneira, estão expostas aos períodos de pico de alta concentração das fitotoxinas (Tanveer et al., 2012). Além disso, a presença de uma camada de cutícula protetora menos pronunciada sobre a raiz primária torna essa superfície mais permeável a fitotoxinas do que as superfícies do hipocótilo, o que pode resultar numa maior penetração e concentração destes compostos no interior dos tecidos da raiz (Yoshimura et al., 2011). O crescimento radicular é caracterizado por altas taxas metabólicas, e por esta razão as raízes são altamente susceptíveis ao estresse ambiental, como os aleloquímicos no substrato (Cruz-Ortega et al., 1998). Em nível celular, o aleloquímico induz a peroxidação lipídica, afeta as atividades enzimáticas e rapidamente despolariza a membrana celular da raiz, causando um aumento generalizado na permeabilidade da membrana e bloqueando, assim, a absorção dos nutrientes (Santos et al., 2008). Considerando que o sistema radicular é a grande ligação das plantas com o meio físico, sendo o caminho para a entrada de água e nutrientes minerais, a má formação das raízes pode afetar o estado fisiológico das plantas e, conseqüentemente, evitar o estabelecimento das espécies daninhas. Khanh et al. (2005) relataram que o maior nível de supressão alelopática pode ocorrer quando os níveis máximos de fitotoxinas coincidem com os estágios iniciais de crescimento da planta.

A redução no crescimento das plântulas de amendoim-bravo tratadas com as frações de *S. saponaria* pode ser associada com a inibição do alongamento das células do metaxilema, sugerindo provável interferência dos aleloquímicos no equilíbrio hormonal (Gatti et al., 2010). Estudos recentes revelaram que os fitormônios desempenham um papel importante no controle da divisão celular, no crescimento celular e na diferenciação celular em zonas distintas das raízes (Takatsuka e Umeda, 2014). A auxina pode ser considerada um importante sinal vegetal de curta a longa distância, capaz de controlar vários processos de desenvolvimento, incluindo a padronização do desenvolvimento radicular (Friml et al., 2002; Petersson et al., 2009), a divisão celular e o alongamento das células nas raízes (Ding e Friml, 2010). O transporte polar das auxinas, mediado por transportadores de efluxo do tipo PIN (*pin-shaped inflorescences*), é essencial para criar gradientes de auxina e promover o desenvolvimento adequado dos órgãos (Tanaka et al., 2006).

Em uma análise fitoquímica, Wahab e Selim (1985) identificaram flavonóides, lipídios e esteróides em extratos apolares de sementes de *S. saponaria*. Lemos et al. (1992) isolaram uma nova saponina a partir da fração AcOEt de frutos de *S. saponaria*, e relataram atividade antimicrobiana. Estudos usando cromatografia a líquido de alta eficiência, com detecção ultravioleta e espectrometria de massa, mostraram que os principais glicosídeos presentes nos frutos dessa espécie são saponinas (SAP) derivadas dos triterpenos hederagenina e ácido oleanólico, além de oligoglicosídeos de sesquiterpenos acíclicos (ASOGs). Usando esses métodos de análise, foram detectados até 30 SAPs e 63 ASOGs (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006; Pelegrini et al., 2008). No presente trabalho, o ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico foi identificado na fração AcOEt obtida das folhas de *S. saponaria*. Este metabólito é um ácido monoterpreno e não foi relatado na literatura. A classe dos terpenos é amplamente relatada no gênero *Sapindus* (Pelegrini et al., 2008; Huang et al., 2008; Jeyabalan e Palayan, 2009; Morikawa et al., 2009; Eddaya et al., 2013), apresentando diversas atividades biológicas e propriedades farmacológicas, como atividades antidiabética (Mahar et al., 2011), antifúngica (Tsuzuki et al., 2007) e antibacteriana (Lasisi et al., 2012).

O ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico apresentou atividade fitotóxica nas espécies daninhas estudadas. O efeito inibitório desse composto foi superior ao da fração AcOEt apenas na germinação dos diásporos de capim-arroz e amendoim-bravo, enquanto que sobre o crescimento das plântulas essa fração apresentou maior atividade inibitória. Teerarak et al. (2012) também observou que o efeito inibitório da odorina (composto ativo) sobre a germinação e crescimento das plântulas de capim-arroz diminuiu em comparação com a mistura da fração bruta de AcOEt. Esses resultados indicam que a fração AcOEt pode conter muitos constituintes químicos ativos que agem sinergicamente. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com as observações de sinergismo dos compostos biológicos registrados por Kilani et al. (2008) e Teerarak

et al. (2012). Dessa forma, esta abordagem exigirá uma investigação mais aprofundada para identificar outros metabólitos biologicamente ativos.

## 5. Conclusão

A fração AcOEt proveniente do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* apresentou efeito inibitório superior ao da fração hexânica sobre o desenvolvimento das plântulas. O ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, isolado e identificado da fração AcOEt, também inibiu a germinação e o crescimento do capim arroz e amendoim-bravo; porém, essa fração atuou com mais intensidade na redução do crescimento das plântulas. Dessa maneira, os compostos presentes na fração AcOEt obtida das folhas de *S. saponaria* podem ser um potente regulador de crescimento das plântulas daninhas e uma alternativa promissora para o manejo sustentável dessas espécies.

## 6. Referências

ALIOTTA, G.; CAFIERO, G.; OTERO, A.M. Weed germination, seedling growth and their lesson for allelopathy in agriculture. In: Reigosa, M.J.; Pedrol, N.; González, L. (ed.). **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Springer, pp 285-297, 2006.

ASHRAFI, Z.Y.; SADEGHI, S.; MASHHADI, H.R. Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of seedling quack grass (*Agropyrum repens*). **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 22, p. 37-43, 2009.

BATISH, D.R.; ARORA, K.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**, v. 26, p. 566-571, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 609-636, 1999.

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 2039-2057, 1998.

DING, Z.; FRIML, J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 12046-12051, 2010.

DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.

EDDAYA, T.; BOUGHADAD, A.; SIBILLE, E.; CHAIMBAULT, P.; ZAID, A.; AMECHROUQ, A. Biological activity of *Sapindus mukorossi* Gaerten (Sapindaceae) aqueous extract against *Thysanoplusia orichalcea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 325-332, 2013.

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

FRIML, J.; BENKOVÁ, E.; BLILOU, I.; WISNIEWSKA, J.; HAMANN, T.; LJUNG, K.; WOODY, S.; SANDBERG, G.; SCHERES, B.; JÜRGENS, G.; PALME, K. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 108, p. 661-673, 2002.

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

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. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, v. 31, p. 239-248, 2013.

HAGEMANN, T.R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J.A.; MARTIN, T.N.; PAGLIOSA, E.S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010.

HE, H.Q.; SHEN, L.H.; XIONG, J.; JIA, X.L.; LIN, W.X.; WU, H. Conditional genetic effect of allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.) under different environmental conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 211-218, 2004.

HONG, N.H.; XUAN, T.D.; TSUZUKI, E.; TERAHO, H.; MATSUO, M.; KHANH, T.D. Weed control of four higher plant species in paddy rice fields in Southeast Asia. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 190, p. 59-64, 2004.

HUANG, H.C.; WU, M.D.; TSAI, W.J.; LIAO, S.C.; LIAW, C.C.; HSU, L.C.; WU, Y.C.; KUO, Y.H. Triterpenoid saponins from the fruits and galls of *Sapindus mukorossi*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1609-1616, 2008.

JEYABALAN, S.; PALAYAN, M. Antihyperglycemic and antidiabetic activity of leaves extracts of *Sapindus emarginatus* Vahl. **Asian Biomed**, v. 3, p. 313-318, 2009.

INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.

- KHAN, M.; HUSSAIN, F.; MUSHARAF, S.; IMDADULLAH. Allelopathic effects of *Rhazya stricta* decne on seed germination and seedling growth of maize. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 30, p. 6391-6396, 2011.
- KILANI, S.; SGHAIER, M.B.; LIMEM, I.; BOUHLEL, I.; BOUBAKER, J.; BHOURI, W.; SKANDRANI, I.; NEFFATTI, A.; AMMAR, R.B.; DIJOUX-FRANCA, M.G.; GHEDTRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 9004–9008, 2008.
- KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1-7, 2004.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.
- LASISI, A.A.; AYINDE, B.W.; ADELEYE, A.O.; ONOCHA, P.A.; OLADOSU, I.A.; IDOWU, P.A. New triterpene isovanniloyl and antibacterial activity of constituents from the roots of *Paullinia pinnata* Linn (Sapindaceae). **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 1-6, 2012.
- LEMOS, T.L.G., MENDES, A.L.; SOUSA, M.P.; BRAZ FILHO, R. New saponin from *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v. 63, p. 515-517, 1992.
- MAHAR, K.S.; RANA, T.S.; RANADE, S.A.; MEENA, B. Genetic variability and population structure in *Sapindus emarginatus* Vahl from India. **Gene**, v. 485, p. 32-39, 2011.
- MORIKAWA, T.; XIE, Y.; ASAO, Y.; OKAMOTO, M.; YAMASHITA, C.; MURAOKA, O.; MATSUDA, H.; PONGPIRIYADACHA, Y.; YUAN, D.; YOSHIKAWA, M. Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1166-72, 2009.
- 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, p. 59-64, 2003.
- PARVEZ, S.S.; PARVEZ, M.M.; NISHIHARA, E.; GEMMA, H.; FUJII, Y. *Tamarindus indica* L. leaf is a source of allelopathic substance. **Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 107-115, 2003.
- PELEGRINI, D.D.; TSUZUKI, J.K.; AMADO, C.A.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.
- PETERSSON, S.V.; JOHANSSON, A.I.; KOWALCZYK, M.; MAKOVEYCHUK, A.; WANG, J.Y.; MORITZ, T.; GREBE, M.; BENFEY, P.N.; SANDBERG, G.; LJUNG, K. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by highresolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. **Plant Cell**, v. 21, p. 1659-1668, 2009.

- PIMENTEL-GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.
- PRATI, D.; BOSSDORF, O. Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, p. 285-288, 2004.
- RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6 ed. Londrina: Edição dos Autores, 2011.
- SAMPIETRO, D.A.; VATTUONE, M.A. Sugarcane straw and its phytochemicals as growth regulators of weed and crop plants. **Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 21-27, 2006.
- SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M.; MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. the possible mode of action. **Journal Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- SILVA, R.M.G.; SARAIVA, T.S.; SILVA, R.B.; GONÇALVES, L.A.; SILVA, L.P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens*. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 632-637, 2010.
- SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; HAVLIK, J.; DAMME, P.V.) Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation**, v. 59, p. 227-236, 2009.
- SOUZA, F.M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S.C.J.G.A.; RODRIGUES, R.R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 1, p. 169-174, 2010.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.
- TANAKA, H.; DHONUKSHE, P.; BREWER, P.B.; FRIML, J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 23, p. 2738-2754, 2006.
- TANVEER, A.; JABBAR, M.K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R.N.; JAVAID, M.M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.
- TAKATSUKA, H.; UMEDA, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 2633-2643, 2014.
- TAWAHA, A.M.; TURK, M.A. Allelopathic effects of Black Mustard (*Brassica nigra*) on germination and growth of Wild Barley (*Hordeum spontaneum*). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 189, p. 298-303, 2003.

TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, 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 and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.

WAHAB, S.M.A.; SELIM, M.A. Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v. 56, p. 167-168, 1985.

WANDSCHEER, A.C.D.; PASTORINI, L.H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 949-953, 2008.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

VIDAL, A.R.; WINKLER, L.M. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: ii - distribuição geográfica e caracterização genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 10, p. 461-465, 2004.

XUAN, T.D.; SHINKICHI, T.; KHANH, T.D.; CHUNG, I.M. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, n. 3, p. 197-206, 2005.

YOSHIMURA, H.; SAWA, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 320-328, 2011.

## **Informação Suplementar - Anexos**

Tabela 1S. Dados de RMN 1D e 2D referentes ao ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

Posição	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm) HSQC	COSY	HMBC
1	-o-	182.6		
2	5.690 ( <i>s</i> )	112.0	4 ( <i>f</i> )	26.9; 35.9; 45.6; 86.7; 172.0; 182.6
3	-o-	172.0		
4	1.786 ( <i>s</i> )	26.9		45.6; 182.6
1'	-o-	35.9		
2'	-o-	86.7		
3a'	1.532 ( <i>dd</i> ; 14.0, 4.0 Hz)	47.3	3b'; 4'	26.4; 30.6; 35.9; 45.6; 66.8
3b'	1.980 ( <i>dt</i> ; 14.0, 2.4 Hz)	66.8	3a'; 4'; 5b'	26.4; 30.6; 35.9; 45.7; 66.8
4'	4.331 ( <i>m</i> )	66.8	3a'; 3b'; 5a'; 5b'	35.9; 45.6; 47.3; 86.7
5a'	1.780 ( <i>dd</i> ; 14.0, 4.0 Hz)	45.6	5b'; 4'	26.9; 66.8; 86.7
5b'	2.460 ( <i>dt</i> ; 14.0, 2.4 Hz)	26.4	5a'; 4'; 3b'(w)	26.4; 47.3; 86.7; 172.0
6'	1.472 ( <i>s</i> )	26.4		30.6; 35.9; 47.3; 66.8; 182.6
7'	1.274 ( <i>s</i> )	30.6		26.4; 35.9; 47.3; 182.6

*s*: singleto; *dd*: duplo-dubleteo; *dt*: duplo-tripleteo; *sl*: singleto-largo.

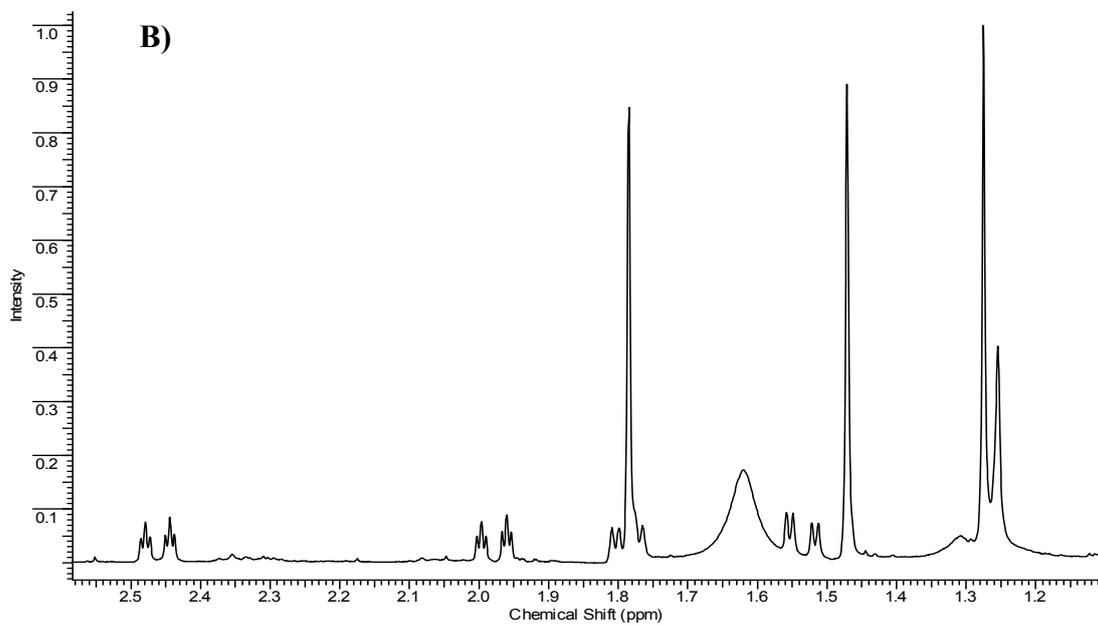
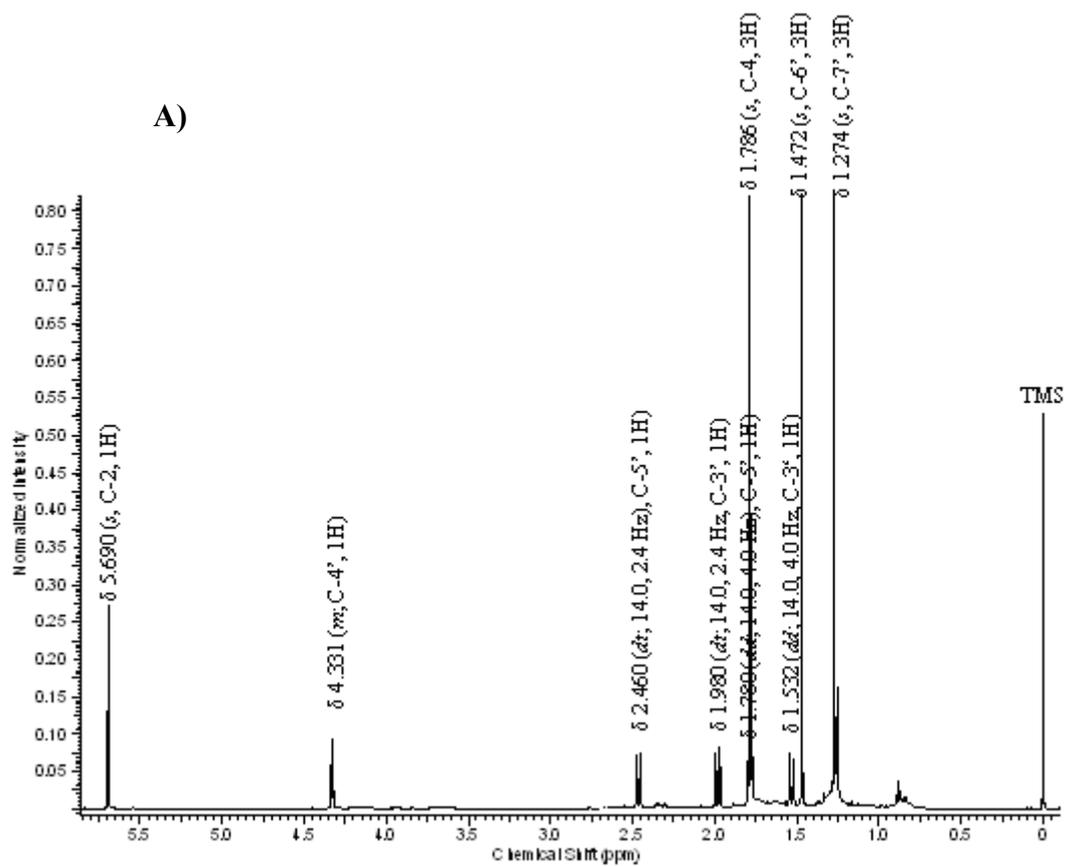


Figura 1S. **A)** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico; **B)** Ampliação entre 1,0 e 2,5 ppm.

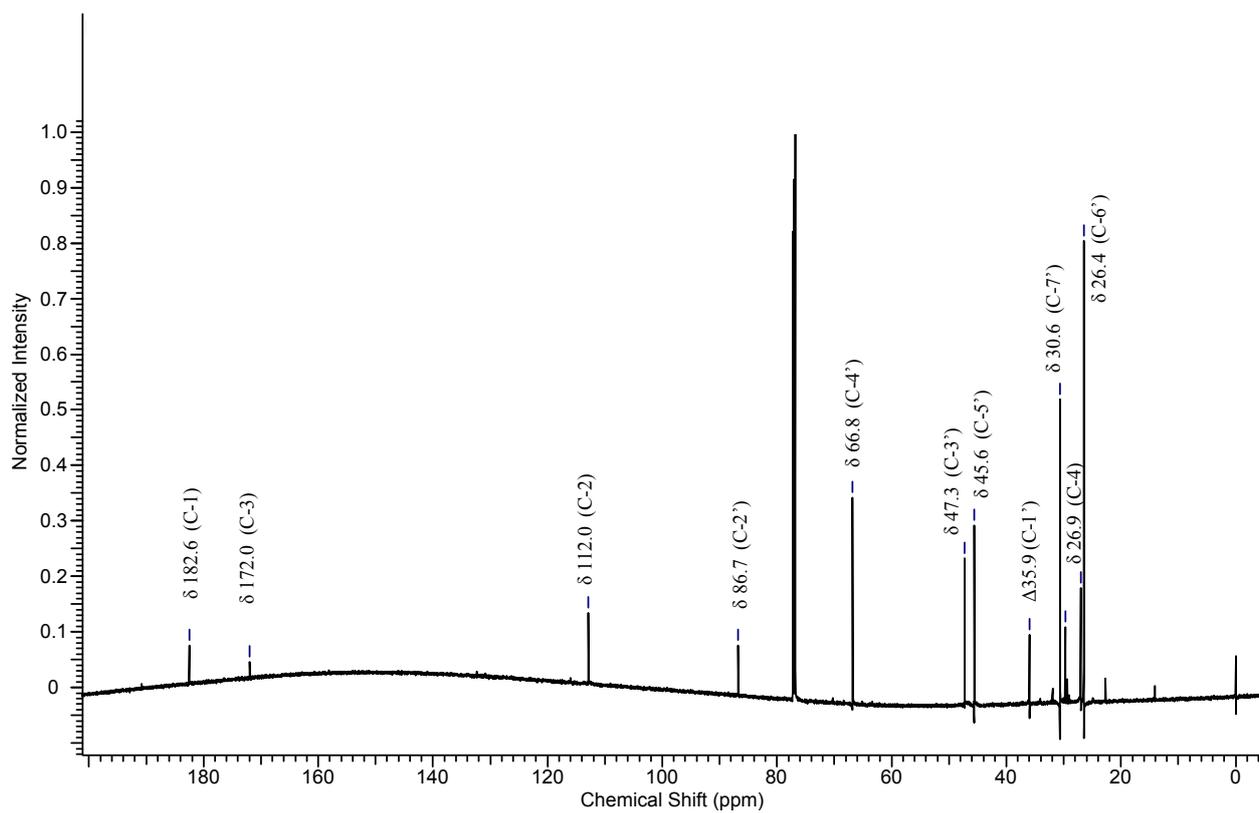


Figura 2S. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

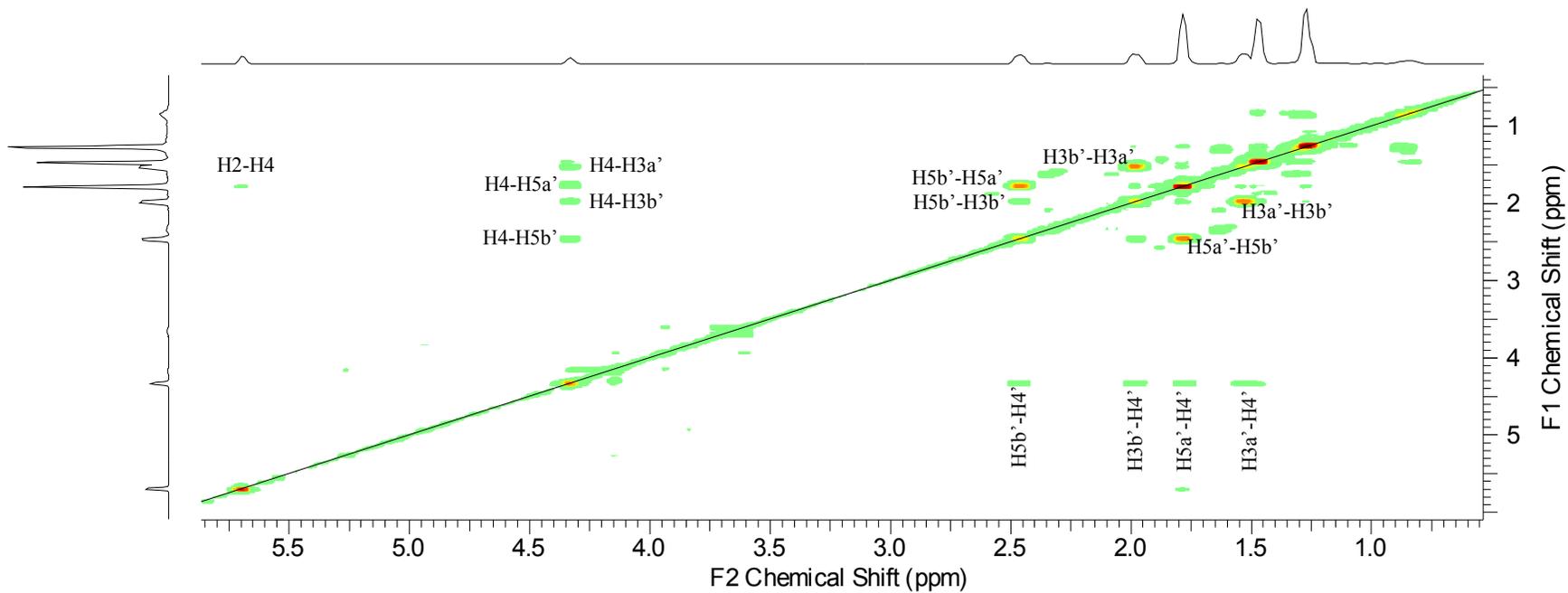


Figura 3S. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

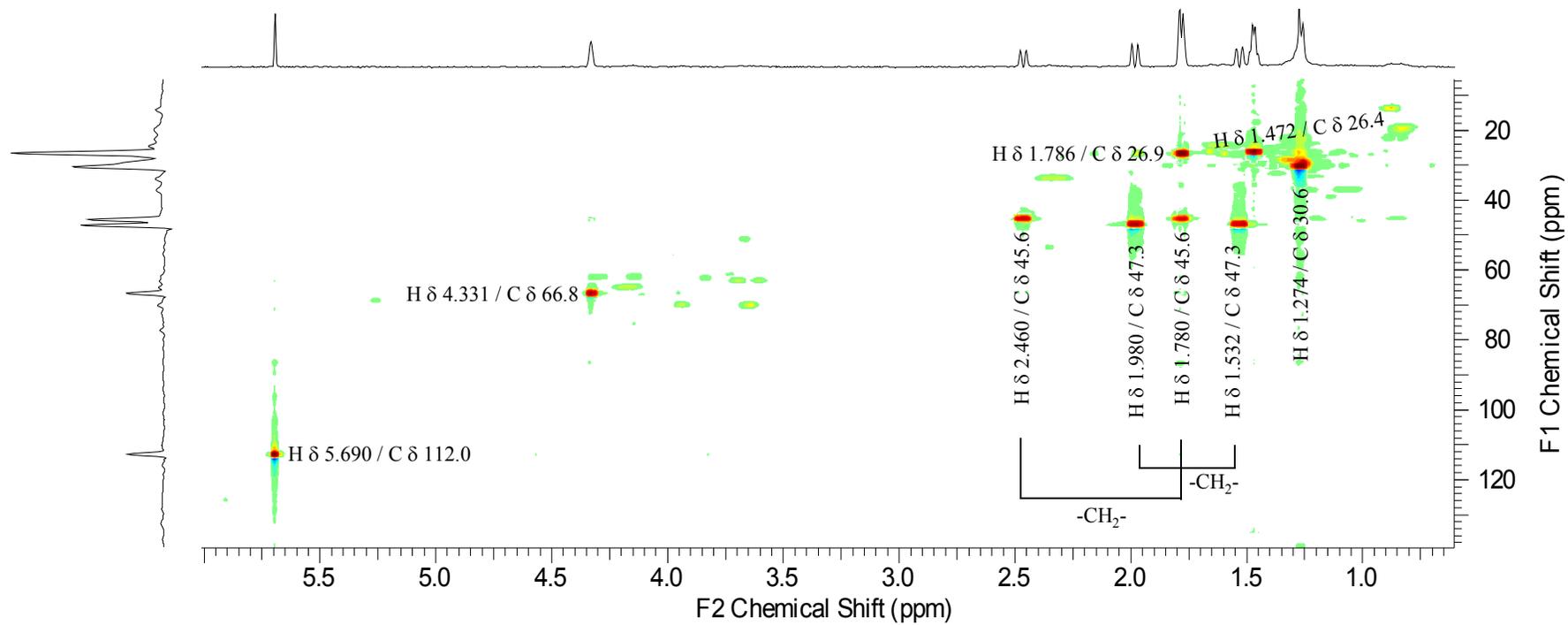


Figura 4S. Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

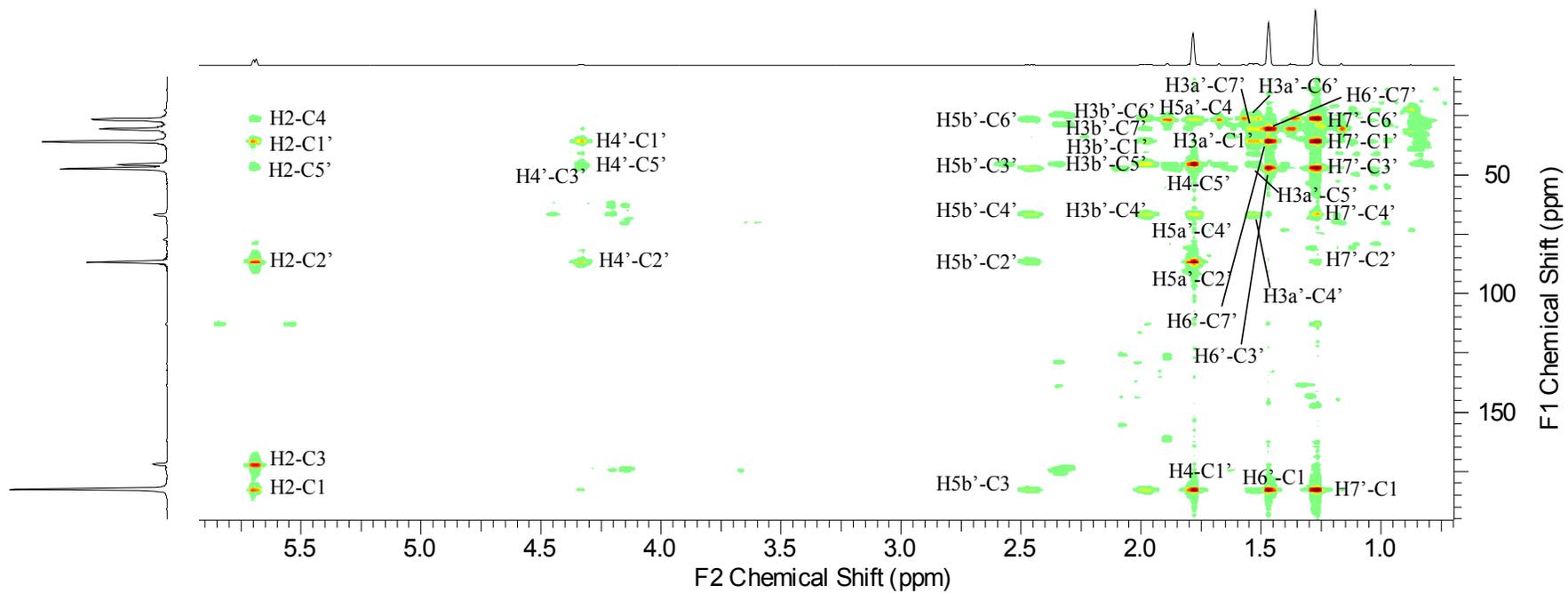


Figura 5S. Espectro de HMBC (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

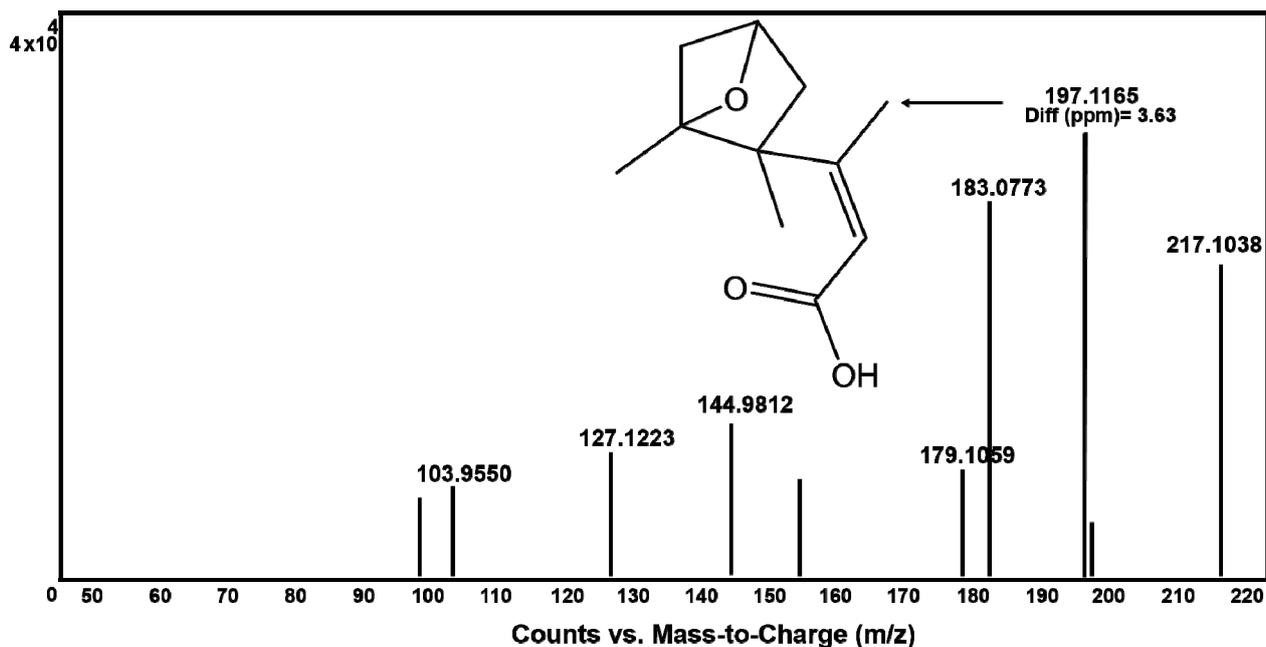


Figura 6S. Espectro de massas *Full-scan* ESI(+) e estrutura do composto isolado (ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico).

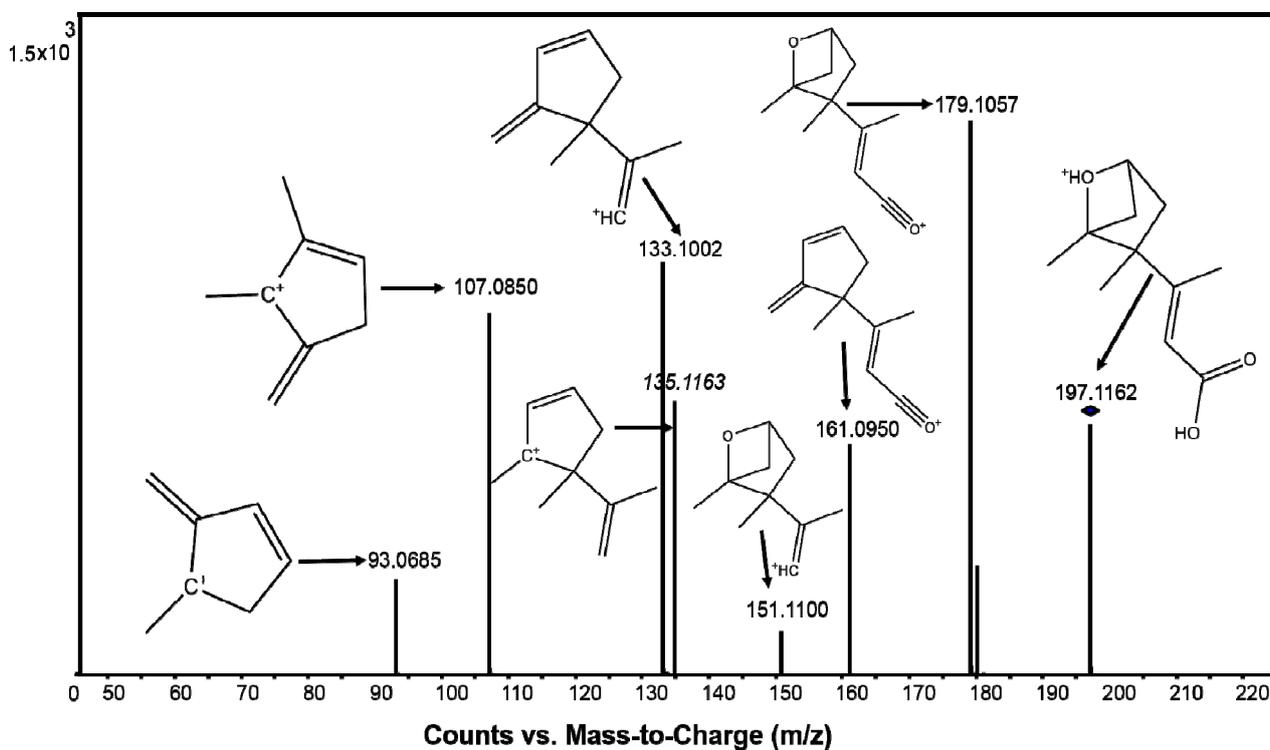


Figura 7S. Espectrometria de massas sequencial (MS/MS) do íon molecular  $m/z$  197.1165 ( $[M+H]^+$ ) e proposta de fragmentação, confirmando a estrutura molecular do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico.

## CAPÍTULO V

### Potencial pesticida dos extratos fracionados de folhas de *Sapindus saponaria* L.

**RESUMO** – A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários com atividade pesticida. Considerando a importância que representa o uso de extratos botânicos dentro do manejo integrado de pragas, este trabalho teve como objetivos analisar a atividade dos extratos fracionados de folhas de *Sapindus saponaria* L. sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliar o potencial inseticida das frações oriundas do extrato foliar de *S. saponaria* sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) e, isolar e identificar os principais metabólitos secundários. O extrato bruto etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol. O extrato foi fracionado por partição líquido-líquido utilizando hexano, acetato de etila (AcOEt) e butanol. No bioensaio com coleóptilos de trigo, as frações foram pré-solubilizadas em DMSO ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) e diluídas em solução tampão nas concentrações de 0,2; 0,4 e  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ . As frações de hexano e AcOEt apresentaram elevada atividade fitotóxica sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo, porém a fração hexânica apresentou maior porcentagem de inibição em relação ao controle, mesmo em baixas concentrações. Dessa maneira, para avaliar o potencial inseticida do extrato foliar de *S. saponaria*, as frações hexânica e AcOEt foram solubilizadas em água Milli-Q e DMSO ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) nas concentrações de 0,3125; 0,6250; 1,25; 2,5 e  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A avaliação da mortalidade dos adultos e ninfas de *T. citricidus* foi realizada após 24 e 48 horas da aplicação das soluções. As diferentes concentrações das frações de hexano e AcOEt ocasionaram aumento significativo nas taxas de mortalidade de adultos e ninfas de pulgão-preto dos citros, já nas primeiras 24 horas após a aplicação das soluções. Entretanto, a toxicidade da fração hexânica sobre esses afídeos foi superior a da fração AcOEt, principalmente, nas concentrações mais baixas das soluções. Com base nos resultados dos bioensaios, a fração hexânica foi submetida ao fracionamento e, as principais substâncias identificadas foram flavonóis derivados do caempferol e quercetina. Dessa maneira, *S. saponaria* pode ser uma espécie doadora de compostos com potencial inseticida e herbicida, sendo uma boa candidata para o fornecimento de aleloquímicos para uso futuro na agricultura.

**Palavras-chave:** bioatividade, coleóptilos de trigo, flavonóides, *Toxoptera citricidus*, sabão-de-soldado.

**ABSTRACT** – (Pesticide potential of *Sapindus saponaria* L. leaf extract). The diversity of flora in Brazil presents a huge potential for the production of secondary compounds with pesticidal activity. Considering the importance that represents the use of botanical extracts within the integrated pest management, this study aimed to analyze the activity of fractionated extracts of *Sapindus saponaria* L. leaves on the elongation of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles, evaluate the insecticide potential of fractions obtained from *S. saponaria* leaf extract on the mortality of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) adults and nymphs, and isolate and identify the main secondary metabolites. The crude ethanol extract was prepared from 100 g of dry plant material in 500 mL of ethanol. The extract was fractionated by liquid-liquid partition using hexane, ethyl acetate (EtOAc) and butanol mixture. In wheat coleoptiles bioassay, the fractions were predissolved in DMSO ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) and diluted in a buffer solution at concentrations of 0.2, 0.4 and  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ . The hexane and EtOAc fractions presented high phytotoxic activity on the growth of wheat coleoptiles, but the hexane fraction showed the highest percentage inhibition over control, even at low concentrations. Thus, to evaluate the insecticide potential of *S. saponaria* leaf extract, the hexane and EtOAc fractions were solubilized in Milli-Q water and DMSO ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) at concentrations of 0.3125, 0.6250, 1.25, 2.5 and  $5.0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Evaluation of the mortality of *T. citricidus* adults and nymphs was performed 24 and 48 hours after application of the solutions. The different concentrations of hexane and EtOAc fractions caused significant increase in mortality rates of black citrus aphids adults and nymphs, already in the first 24 hours after application of the solutions. However, the hexane fraction showed higher toxicity than EtOAc fraction on these aphids, mainly at the lowest concentrations of the solutions. Based on the results of bioassays, the hexane fraction was subjected to fractionation and the main substances identified were flavonols derivative of kaempferol and quercetin. Thus, *S. saponaria* can be a donor species of compound with insecticide and herbicide potential, and a good candidate to supply allelochemicals for future use in agriculture.

**Keywords:** bioactivity, wheat coleoptile, flavonoids, *Toxoptera citricidus*, soapberry.

## 1. Introdução

A utilização de pesticidas sintéticos na agricultura é uma prática ainda necessária no controle de pragas ou doenças para se atingir altos índices de produtividade e conseguir desta forma atender a demanda crescente de alimentos (Lopes et al., 2009). Alguns destes pesticidas aplicados, além de nem sempre serem eficientes, acarretam diversos problemas, tais como contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, destruição de inimigos naturais, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aumento de frequência de insetos e plantas resistentes (Roel et al., 2000; Marangoni et al., 2012; Khaliq et al., 2013). A busca por outros métodos de controle inclui a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao ambiente, dentre os quais pode ser citada a utilização de inseticidas ou herbicidas de origem vegetal (Roel et al., 2000; Krinski et al., 2014). Além disso, tais compostos podem proporcionar ao agricultor, um método fácil, natural e econômico de manejo de insetos e plantas daninhas, utilizando as ferramentas do seu próprio ecossistema (Boiça Júnior et al., 2005).

Os produtos à base de plantas, além de terem efeito herbicida comprovado (como visto nos capítulos anteriores) apresentam uma diversidade de compostos ativos que agem sinergicamente sobre os insetos. Características como atraentes, desalojantes ou repelentes, entre outras podem ser empregadas em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas dirigidas para controle e monitoramento das populações de insetos (Navarro-Silva et al., 2009; Krinski et al., 2014). Os primeiros fitoinseticidas utilizados foram a nicotina extraída de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), a rianodina extraída de *Ryania speciosa* Vahl (Flacuortiaceae), a sabadina e outros alcalóides extraídos de *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) A. Gray ex Benth. (Liliaceae), as piretrinas extraídas do piretro *Chrysanthemum cinerariaefolium* L. (Asteraceae) e a rotenona extraída de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae) (Lagunes e Rodríguez, 1992; Roel et al., 2000). Essas substâncias, como os alcalóides, terpenóides e derivados fenilpropanóides, são de baixo peso molecular e funcionariam naturalmente como agentes defensivos contra predadores (Barreto, 2005).

Os derivados botânicos podem causar diversos efeitos sobre os insetos, tais como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, redução da motilidade intestinal, interferência na síntese do ecdisônio, inibição da biossíntese da quitina, deformações em pupas e adultos, redução na fecundidade, longevidade, esterilização, inibição na oviposição e mortalidade de formas imaturas e adultas (Schmutterer, 1990; Mordue e Backwell, 1993; Boiça Júnior et al., 2005; Gonzaga et al., 2008; Jesus et al., 2011). Dessa maneira, os metabólitos secundários podem ser utilizados como um método alternativo aos inseticidas sintéticos, pois normalmente agem em doses baixas e com ações

específicas, além de poucos serem tóxicos a mamíferos (Regnault-Roger, 1997; Krinski et al., 2014).

De um modo geral, podem ser reconhecidas duas abordagens quanto à utilização de plantas/substâncias com atividades sobre os insetos. Na primeira delas a atividade é reconhecida, os compostos são isolados, identificados e posteriormente sintetizados em larga escala. Nesse processo há a possibilidade de alterações químicas em grupos funcionais responsáveis pela atividade de forma a acentuar os efeitos desejados ou diminuir a toxicidade, quando houver (Fazolin et al., 2002). No segundo caso, uma vez identificada a atividade inseticida em alguma espécie vegetal, sua utilização se dá na forma de extrato vegetal bruto. A escolha da melhor abordagem está relacionada à complexidade das estruturas químicas das substâncias envolvidas que viabilizará ou não sua síntese, bem como às considerações de ordem econômica e tecnológica (Tang e Yang, 1988; Fazolin et al., 2002).

Estudos para o controle de pragas e doenças por meio de inseticidas botânicos são realizados principalmente nas culturas de grande importância e, entre elas destacam os citros (Neves et al., 2010). A citricultura é ameaçada por diferentes problemas fitossanitários, seja pelo ataque de pragas e doenças, ou pela introdução de novos organismos (Guerreiro et al., 2005). *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae), conhecido popularmente como pulgão-preto é um dos principais afídeos de plantas cítricas (Koller, 1994; Balfour e Khan, 2012). Esse inseto fitófago ataca principalmente os brotos novos das plantas cítricas, sugam a seiva e provocam encarquilhamento e atrofia das folhas e brotos, liberando ainda uma substância açucarada expelida pela codícola que permite o desenvolvimento de um fungo negro conhecido como fumagina. Além disso, esse pulgão também transmite o vírus da tristeza dos citros em plantas sadias (Gallo et al., 2002; Gravena, 2003; Gonzaga et al., 2008).

A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários com atividade inseticida. Dentre essas espécies, destaca-se *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae, sabão-de-soldado), uma árvore nativa, encontrada habitualmente em locais úmidos, nas florestas pluvial e semidecídua, nas regiões sudeste e nordeste do Brasil (Albiero et al., 2001). Ela representa uma boa fonte de saponinas bioativas, entretanto, há uma falta de estudos detalhados sobre sua composição química e suas atividades biológicas, uma vez que estas têm sido concentradas, especificamente, em propriedades farmacêuticas (Tsuzuki et al., 2007; Pelegrini et al., 2008). O potencial inseticida dessa espécie já foi avaliado em relação a pragas como *Aedes aegypti* (Barreto et al., 2006), *Spodoptera frugiperda* (Santos et al., 2008), *Trialeurodes vaporariorum* (Porrás e Lopez-Avila, 2009) e *Plutella xylostella* (Boiça Júnior et al., 2005; Jesus et al., 2011), obtendo-se resultados promissores. Porém, não foram encontrados dados na literatura sobre o potencial de *S. saponaria* no controle do pulgão-preto dos citros.

Portanto, tendo em vista a importância que representa o uso de extratos botânicos dentro do manejo integrado de pragas e o interesse de se conhecer as diferentes atividades biológicas de *S. saponaria*, os objetivos deste trabalho foram: (1) analisar a atividade dos extratos fracionados de folhas de *S. saponaria* sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.), (2) avaliar o potencial inseticida das frações oriundas do extrato foliar de *S. saponaria* sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus* e, (3) isolar e identificar os principais metabólitos secundários.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Obtenção do material vegetal**

Folhas maduras (coloração verde-escura e textura coriácea) de *S. saponaria* foram coletadas no município de São Carlos-SP (22°02' S e 47° 52' W), em maio de 2011. A região é caracterizada pelo tipo climático Aw (Köppen 1948), com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). As folhas foram coletadas diretamente de cinco árvores. Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, durante 72 h, e trituradas em moinho industrial (Mesh 14). Posteriormente, o material foi pesado, embalado a vácuo em sacos plásticos e armazenado sob temperatura ambiente (25 °C), até a realização dos experimentos.

### **2.2. Rota fitoquímica**

#### **2.2.1. Preparo do extrato etanólico e fracionamento**

O extrato etanólico foi preparado na proporção de 100 g de material vegetal seco para 500 mL de etanol e submetido à exaustiva extração etanólica, no escuro e a frio, durante 72 h. Após esse período, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato bruto etanólico. O extrato bruto (60g) foi suspenso em metanol (MeOH) e água deionizada na proporção 1:3 (v/v), resultando na fase aquosa. Essa solução foi fracionada por partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila (AcOEt) e butanol, obtendo-se as frações: hexânica (22,27 g), AcOEt (8,43 g), butanólica (10,92 g) e aquosa (11,34 g).

## 2.2.2. Fracionamento cromatográfico, purificação e identificação das substâncias

A fração hexânica (7,0 g), selecionada a partir dos resultados obtidos nos bioensaios, foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica contendo sílica gel (230-400 mesh), eluída em gradiente de hexano/acetona (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9 v/v), acetona/AcOEt (9:1; 1:1 v/v), AcOEt, AcOEt/MeOH (1:1; 2:8 v/v), MeOH e MeOH/água (9:1 v/v). Esse procedimento rendeu um total de 31 frações. Após análise e reunião monitorada com base no perfil de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), cinco frações foram selecionadas e suas atividades biológicas foram avaliadas sobre coléoptilos de trigo. Cada cromatoplaça (placas de sílica gel Aldrich®, 25 µm) foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com *Oleum* (solução de 10 mL de ácido sulfúrico, 200 mL de ácido acético e 40 mL de água), seguida de aquecimento a 120 °C durante 3 min.

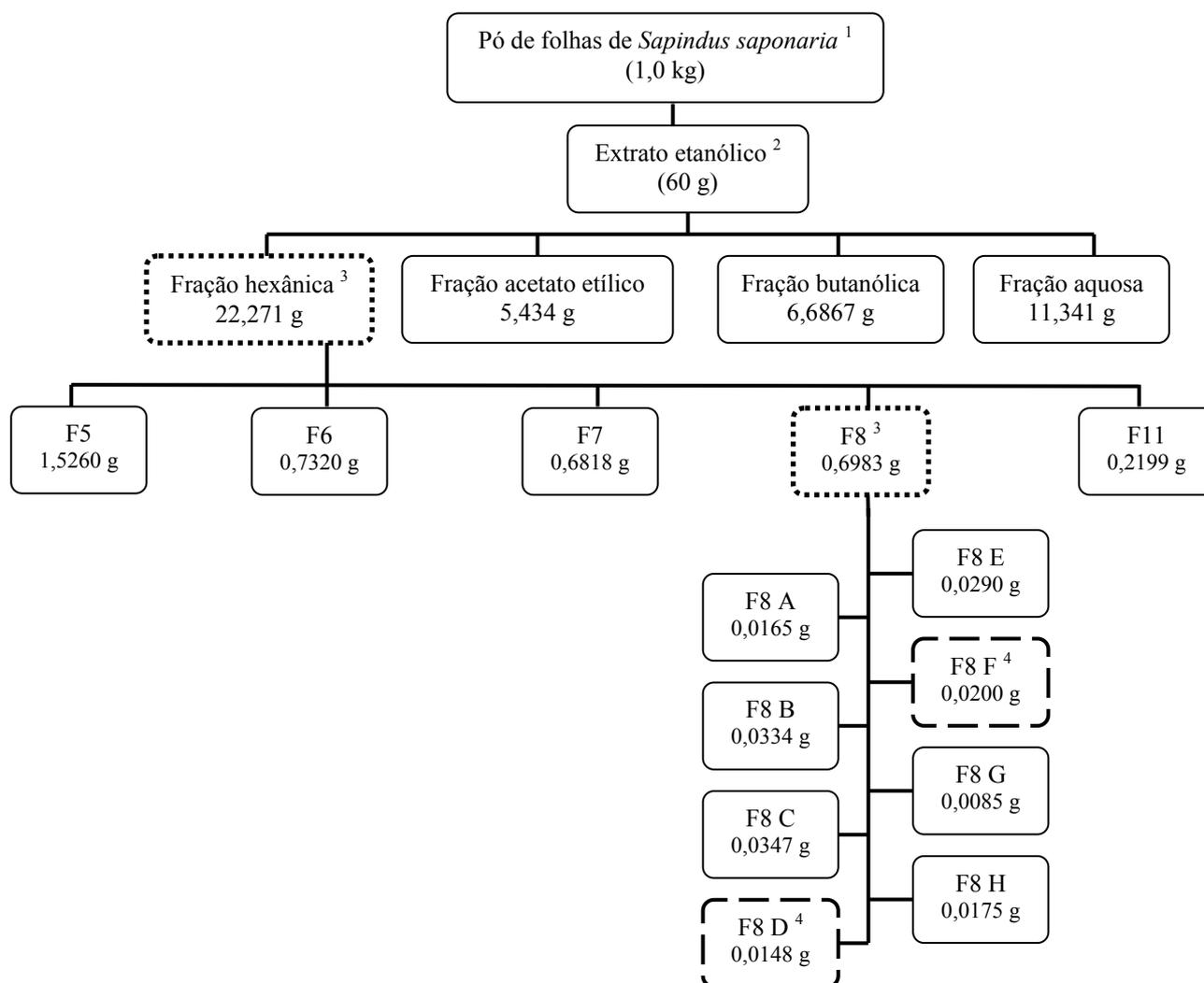


Figura 1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados a partir do pó das folhas de *S. saponaria*, com os respectivos rendimentos. <sup>1</sup>Extração etanólica. <sup>2</sup>Partição líquido-líquido. <sup>3</sup>Cromatografia de coluna (sílica gel). <sup>4</sup>Extração em fase sólida (SPE).

De acordo com a análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ , Brücker 600 MHz, 14,1 T) e com os resultados obtidos no bioensaio, a fração F8 (hexano/acetona 6:4; 0,6983 g) foi selecionada e submetida a outro fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel (Figura 1). Foi utilizada como fase móvel a mistura de hexano/acetona (9:1; 8:2; 7:3; 1:1 v/v), acetona, acetona/MeOH (1:1 v/v) e MeOH, resultando em oito sub-frações (Figura 1). A partir das observações em CCDA, seguida pela análise de RMN  $^1\text{H}$ , as sub-frações F8D (hexano/acetona 7:3; 0,0148 g) e F8F (hexano/acetona 7:3; 0,0200 g) foram submetidas a extração em fase sólida (SPE) para purificação das substâncias (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos obtidos na extração em fase sólida (SPE) a partir das sub-frações oriundas da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

Sub-fração	Produtos	Eluente (v/v)	Massa (mg)
F8D	F8D (I)	H <sub>2</sub> O:ACN (9,5:0,5)	1,7
	F8D (II)	H <sub>2</sub> O:ACN (9:1)	1,1
	F8D (III)	H <sub>2</sub> O:ACN (8:2)	0,8
	F8D (IV)	H <sub>2</sub> O:ACN (7:3)	0,6
	F8D (V)*	H <sub>2</sub> O:ACN (1:1)	1,1
	F8D (VI)	ACN	3,2
	F8D (VII)	Acetona	3,8
F8F	F8F (I)*	H <sub>2</sub> O:ACN (9,5:0,5)	3,2
	F8F (II)*	H <sub>2</sub> O:ACN (9:1)	1,3
	F8F (III)	H <sub>2</sub> O:ACN (8:2)	0,8
	F8F (IV)	H <sub>2</sub> O:ACN (7:3)	0,6
	F8F (V)*	H <sub>2</sub> O:ACN (1:1)	3,2
	F8F (VI)	ACN	4,2
	F8F (VII)	Acetona	4,1

(\*) Produtos submetidos ao RMN  $^1\text{H}$ .

### 2.2.3. Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida foi realizada em cartuchos C18 (500 mg/3,0 mL), condicionados com 2,0 mL de acetonitrila (ACN), 2,0 mL de água e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O:ACN (9,5:0,5 v/v). A amostra foi dissolvida em 2 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (1:20 v/v) e aplicada no cartucho condicionado. Em seguida, o cartucho foi eluído com 1,0 mL (2 x 0,5 mL) de H<sub>2</sub>O:ACN (9,5:0,5; 9:1; 8:2; 7:3; 1:1 v/v) e, por

fim, com 3,0 mL de ACN e acetona (Tabela 1). As sete amostras resultantes foram recolhidas em tubos de ensaio (5 mL) e evaporadas em concentrador tipo *Speed Vac*. De acordo com as observações em CCDA, algumas amostras foram submetidas ao RMN  $^1\text{H}$ . Este procedimento foi desenvolvido e aplicado com o propósito de purificar metabólitos parcialmente isolados presentes em baixas quantidades.

As substâncias isoladas foram identificadas por meio das análises de Ressonância Magnética Nuclear 1D (Bruker 600 MHz), em comparação com dados da literatura.

## 2.3. Bioensaios

### 2.3.1. Bioensaio com coleóptilos de trigo

Cariopses de trigo (*Triticum aestivum* L., cultivar BRS Camboatá) foram distribuídas em caixas tipo gerbox forradas com duas folhas de papel de filtro, umedecidas com 10 mL água, sendo tampadas e cobertas por papel alumínio. As caixas foram mantidas em câmara climatizada (estufa B.O.D) a 25 °C no escuro, durante 72 h. Decorrido esse tempo, as caixas foram conduzidas até uma sala com luz verde para que os coleóptilos das plântulas de trigo fossem selecionados e cortados utilizando-se uma guilhotina de Van der Weij. Os ápices dos coleóptilos foram cortados (2 mm) e descartados, enquanto o restante foi cortado em 4 mm e utilizado para o bioensaio (Macías et al., 2010).

As soluções foram preparadas a partir de 10 mg de cada fração ou sub-fração, pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) e diluídas em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL das respectivas soluções, contendo cinco coleóptilos de trigo, sendo tampados por uma película de plástico (Macías et al., 2010). Dois controles foram realizados, um negativo com solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) e, outro positivo com o herbicida oxifluorfem (240  $\text{g L}^{-1}$ ) solubilizado em solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L/mL}$ ), nas mesmas concentrações avaliadas para as frações. Esses tubos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob constante rotação (0,25 rpm), sendo utilizadas três repetições por tratamento (Macías et al., 2010). Após 24 h, os coleóptilos foram retirados dos tubos e medidos com auxílio do programa de digitalização de imagens (Image-Pro Plus<sup>®</sup> 5.0).

Os dados foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo (Macías et al., 2006; Grisi et al., 2014), segundo a expressão abaixo:

$$\text{Inibição/estímulo (\%)} = \left( \frac{((C_r - \bar{C}_t) - (C_r - \bar{C}_c))}{(C_r - \bar{C}_c)} \right) 100,$$

onde:

$C_r$ : comprimento referência do coleóptilo usado no bioensaio (4 mm);

$\bar{C}_t$ : comprimento médio dos coleóptilos, referente aos tratamentos;

$\bar{C}_c$ : comprimento médio dos coleóptilos, referente ao controle.

Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Os resultados foram apresentados em um gráfico de colunas, onde o “0” representa a longitude do controle, enquanto os valores positivos implicam no estímulo da característica analisada, e os negativos na inibição (Macías et al., 2006).

### 2.3.2. Bioensaio de toxicidade: adultos e ninfas de *T. citricidus*

De acordo com os resultados obtidos no bioensaio com coleóptilos de trigo, as frações de hexano e AcOEt foram selecionadas e, pré-solubilizadas em DMSO (dimetilfulfóxido, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) e diluídas em água Milli-Q nas concentrações de 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0  $\text{mg mL}^{-1}$ . Foi realizado um controle com água e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), sendo que previamente a realização do bioensaio, testou-se o efeito desse controle sobre as ninfas e adultos de *T. citricidus*, de forma que o mesmo mostrou-se seguro, não provocando alterações ou mortalidade.

Adultos de *T. citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limon* (L.), localizadas no campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. Posteriormente, foram levados ao Laboratório de Entomologia Econômica do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva para confirmação específica da espécie e, em seguida, dispostos em ramos caulinares jovens do mesmo hospedeiro.

O experimento foi instalado no laboratório com temperatura média de 27,5 °C e UR de 60  $\pm$  10%. As soluções contendo as frações foram pulverizadas diretamente sobre os adultos e ninfas de um dia de *T. citricidus* em placas de Petri (15 cm de diâmetro), com auxílio de um pulverizador, utilizando-se 2 mL por repetição. Posteriormente, os insetos foram transferidos para o conjunto manga de vidro e voil contendo um ramo caulinar jovem de *C. limon*. A avaliação da mortalidade dos adultos e ninfas foi realizada após 24 e 48 h da aplicação das soluções, considerando-se mortos aqueles insetos que não respondiam ao toque de um pincel entomológico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se seis tratamentos e dez repetições, contendo cinco insetos (ninfas e adultos) por repetição.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Procedeu-se à regressão quadrática, quando o resultado da ANOVA foi significativo. A qualidade do ajuste dos modelos foi aferida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). As concentrações letais medianas ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) foram estimadas pela análise de Probit (Finney, 1971), com o auxílio do programa POLO-PC (LeOra Software, 1987). Para comparar as frações e a mortalidade média em função do tempo decorrido após as pulverizações (24 e 48 h) foi realizada a análise conjunta dos dados, uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes, 1990). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2003).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Bioensaio com coleóptilos de trigo

As frações oriundas do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* exerceram atividade inibitória sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo, com efeito dependente da concentração. A fração aquosa, nas concentrações 0,4 e 0,2 mg mL<sup>-1</sup>, não afetou o crescimento do coleóptilo em relação ao controle negativo. A fração hexânica, nas concentrações 0,8 (83%; 4,73 mm), 0,4 (77%; 4,99 mm) e 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (75%; 5,06 mm) e a fração AcOEt, na concentração 0,8 mg mL<sup>-1</sup> (73%; 5,16 mm), tiveram efeito inibitório similar ao do herbicida nas mesmas concentrações de 0,8 (90%; 4,46 mm), 0,4 (77%; 4,98 mm) e 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (73%; 5,13 mm) sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo (Figura 2 e Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento médio dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação do herbicida e das frações do extrato etanólico de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

Frações	Comprimento (mm)			
	0.8 mg mL <sup>-1</sup>	0.4 mg mL <sup>-1</sup>	0.2 mg mL <sup>-1</sup>	Controle
Hexano	4,73 ± 0,85 Bb	4,99 ± 0,62 Cb	5,06 ± 0,74 Cb	8,17 ± 0,92 a
Acetato de etila	5,16 ± 1,13 Bb	5,53 ± 0,94 BCb	5,79 ± 1,52 BCb	8,17 ± 0,92 a
Butanol	6,24 ± 0,97 Ab	6,52 ± 1,18 ABab	7,00 ± 1,47 ABab	8,17 ± 0,92 a
Aquosa	6,28 ± 1,56 Ab	7,67 ± 1,46 Aa	7,47 ± 1,41 Aa	8,17 ± 0,92 a
Herbicida	4,46 ± 0,23 Bb	4,98 ± 0,32 Cb	5,13 ± 0,40 Cb	8,17 ± 0,92 a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as frações e minúsculas para as diluições, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

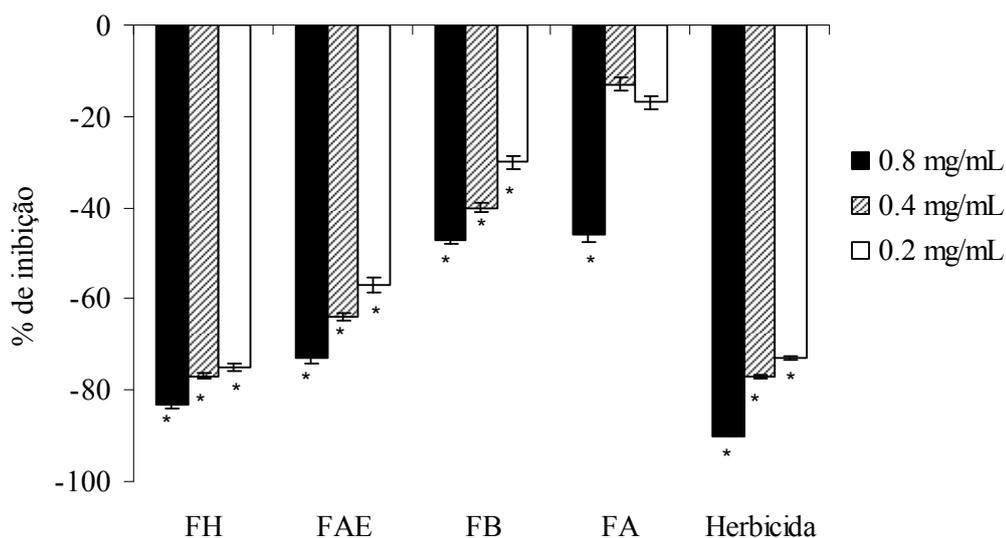


Figura 2. Efeito inibitório das frações de hexano (FH), acetato de etila (FAE), butanol (FB) e aquosa (FA) das folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida oxifluorfem sobre o crescimento dos coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Diferença significativa em relação ao controle negativo.

A fração hexânica apresentou maior porcentagem de inibição em relação ao controle, mesmo em baixas concentrações. Compostos de baixa polaridade presentes nas folhas de *S. saponaria* podem ser responsáveis pela elevada atividade inibitória sobre o alongamento dos coleótilos de trigo. Os testes que utilizam plantas ou tecidos de plantas têm sido bem sucedidos na detecção da atividade biológica de vários compostos sintéticos e naturais (Macías et al., 2000; Hoagland e Williams, 2004). O bioensaio com coleótilos trigo é um teste rápido e sensível para uma vasta gama de substâncias bioativas (Cutler et al., 2000; Macías et al., 2010), incluindo os reguladores de crescimento de plantas, herbicidas, antimicrobianos, micotoxinas e diversos produtos farmacêuticos (Nebo et al., 2014). Vários trabalhos mostram o uso deste bioensaio como uma ferramenta importante na busca de compostos com potencial biopesticida (Macías et al., 2000; Macías et al., 2010).

Um aspecto importante nas pesquisas de alelopatia é a identificação de compostos aleloquímicos envolvidos na interação planta-planta e seu possível modo de ação. O isolamento e o conhecimento da estrutura dos compostos da planta podem resultar na produção de derivados semi-sintéticos (Souza et al., 2011). Dessa maneira, é de grande importância o uso apropriado dos bioensaios para isolar os ingredientes ativos dos diferentes tipos de extratos de plantas.

### 3.2. Mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus*

De acordo com os resultados obtidos no bioensaio com coleóptilos de trigo, as frações de hexano e AcOEt oriundas do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* foram selecionadas para avaliação dos seus efeitos na mortalidade de insetos pragas. Ambas as frações apresentaram potencial inseticida sobre o pulgão-preto dos citros, com efeito dependente da concentração; ou seja, à medida que se aumentou a concentração das soluções, houve aumento da mortalidade dos pulgões. Após 48 horas de exposição, as ninfas tiveram mortalidade máxima (100%) nas concentrações estimadas de 3,22 mg mL<sup>-1</sup>, para a fração hexânica, e 3,28 mg mL<sup>-1</sup>, para a fração AcOEt. O percentual máximo de mortalidade (100%) para o inseto adulto pode ser registrado nas concentrações estimadas de 3,43 e 3,86 mg mL<sup>-1</sup> das frações de hexano e AcOEt, respectivamente (Figuras 3 e 4).

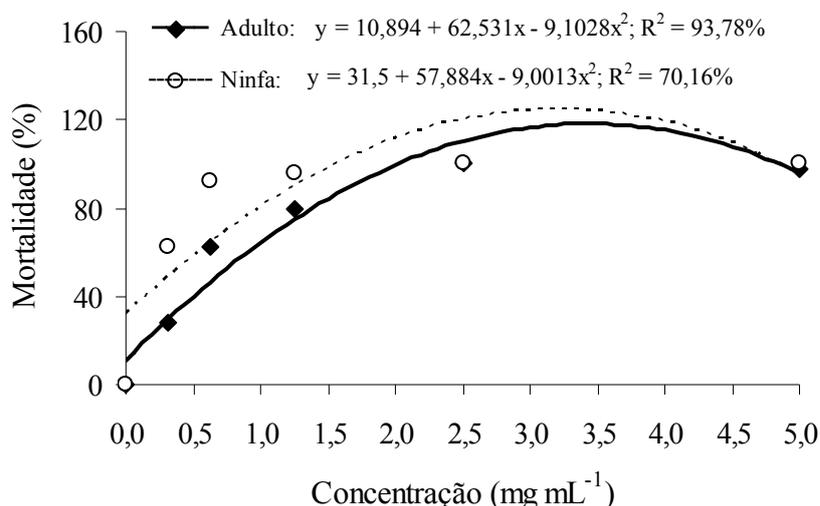


Figura 3. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* submetidos à pulverização de diferentes concentrações da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria*, após 48 horas de exposição.

As ninfas de *T. citricidus* apresentaram maior sensibilidade, sendo que mais de 50% dos pulgões nesse estágio estavam mortos já na concentração mais baixa das frações (0,3125 mg mL<sup>-1</sup>), enquanto para os adultos esse registro foi possível apenas a partir da concentração 1,25 mg mL<sup>-1</sup> (Figuras 5 e 6). De acordo com Anese (2014), o pulgão-preto dos citros no estágio de ninfa também foi mais sensível à atividade tóxica da fração hexânica de *D. brasiliensis* do que o adulto. A redução drástica na sobrevivência das ninfas causada por extratos botânicos tem sido relatada para várias espécies de afídeos (Tang et al., 2002; Pavela et al., 2004; Déla et al., 2014).

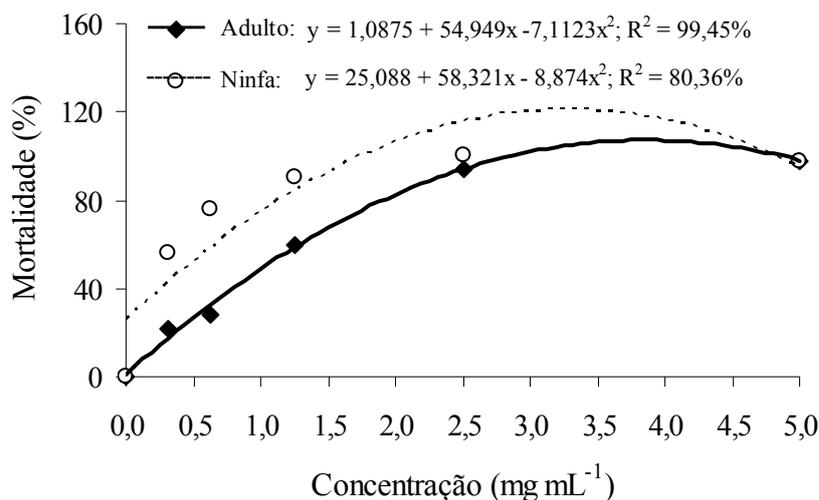


Figura 4. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* submetidos à pulverização de diferentes concentrações da fração acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*, após 48 horas de exposição.

Comparando o efeito das diferentes frações obtidas das folhas de *S. saponaria* sobre a mortalidade dos insetos, verificou-se que a fração hexânica foi a que exerceu maior mortalidade de adultos (hexano: 61,2% > AcOEt: 48,8%) e ninfas (hexano: 83,6% > AcOEt: 73,6%) nas primeiras 24 horas de exposição (Figura 7). A toxicidade da fração hexânica sobre esses afídeos foi superior a da fração AcOEt, principalmente, nas concentrações mais baixas das soluções (Figuras 5 e 6). Para a fração hexânica, concentrações superiores a 1,25 e 2,5 mg mL<sup>-1</sup> proporcionaram, respectivamente, mortalidade acima de 90% de ninfas e adultos de *T. citricidus*; enquanto, para a fração AcOEt, essa taxa de mortalidade ocorreu apenas a partir da concentração 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (ninfas) e 5 mg mL<sup>-1</sup> (adulto), o que indica a maior eficiência da primeira fração (Figuras 5 e 6).

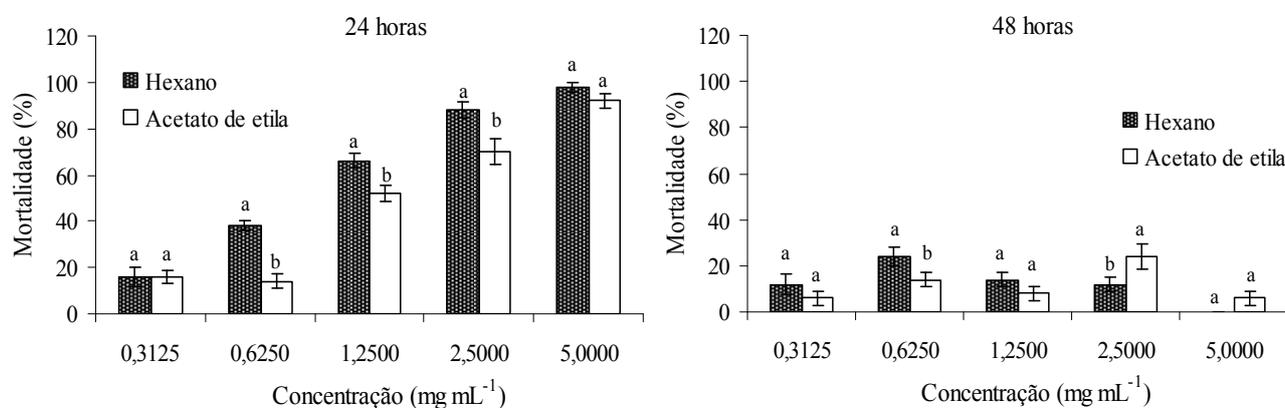


Figura 5. Mortalidade de adultos de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Ao contrário dos resultados apresentados nesse experimento, outros autores observaram a ineficiência do extrato hexânico sobre a mortalidade ninfal, relatando que extratos altamente apolares são menos eficientes do que aqueles com polaridade intermediária (Cubillo et al, 1997; Souza, 2004). No entanto, Coelho et al. (2006) constataram que a polaridade das substâncias contidas nos extratos etanólicos e hexânicos apresentou diferentes taxas de atividade; por exemplo, com a casca da raiz de *Simarouba versicolor* A. St.-Hil. a taxa de mortalidade das ninfas de *Rhodnius milesi* (Hemiptera: Reduviidae) foi de 35% para hexano e 95% para o etanol, e com a raiz de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer a mortalidade foi de 75% para hexano e 20% para o etanol.

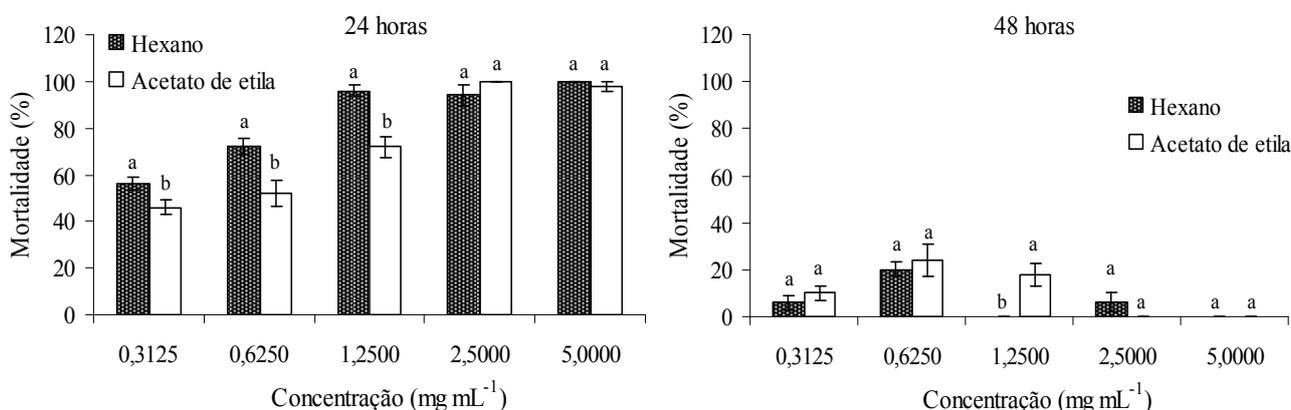


Figura 6. Mortalidade de ninfas de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

A mortalidade de mais de 50% da população de pulgão-preto dos citros (adultos e ninfas) foi alcançada já nas primeiras 24 horas após a aplicação das frações (Figura 7). A morte dos insetos em um curto período de tempo demonstra a ação imediata das frações de *S. saponaria*, principalmente sobre as ninfas de *T. citricidus*. Esse aspecto é bastante importante, já que há risco de perda do produto pela ação da chuva logo após a sua aplicação, conforme destacado por Gonzaga et al. (2008).

A concentração letal CL<sub>50</sub> estimada para os adultos e ninfas de *T. citricidus* foi, respectivamente, de 0,51 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup> da fração hexânica e, 0,84 e 0,26 mg mL<sup>-1</sup> da fração AcOEt (Tabela 3). Estes resultados reforçam as evidências de que mesmo as menores concentrações utilizadas (> que 1,0 mg mL<sup>-1</sup>) no processo de pulverização com as frações de *S. saponaria* foram capazes de controlar pelo menos 50% da população de pulgão-preto dos citros. A CL<sub>90</sub> foi de 1,61 (adulto) e 0,63 mg mL<sup>-1</sup> (ninfa) para a fração de hexano e, 2,72 (adulto) e 1,19 mg mL<sup>-1</sup> (ninfa) para a fração de AcOEt. Os valores elevados da inclinação da curva (coeficiente angular) foram

observados, principalmente, para as ninfas tratadas com a fração hexânica (5,48) (Tabela 3). Segundo Atkins et al. (1973) e Niculau et al. (2013), valores altos de inclinação da curva indicam que pequenas variações na dose do produto promovem grandes variações na mortalidade da praga, resultando em resposta homogênea da população.

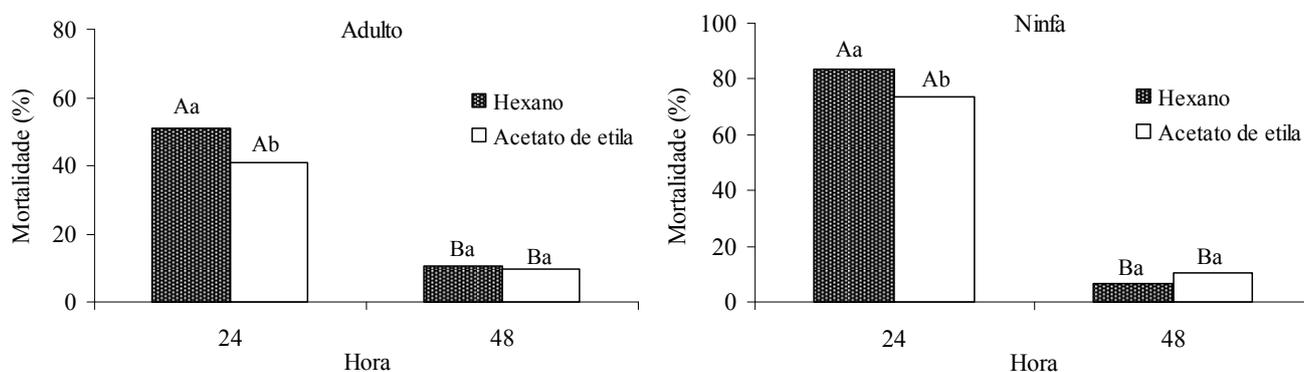


Figura 7. Mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para o tempo de exposição e minúsculas para as frações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Correia (2006) estudou a toxicidade de extratos de timbó (*Lonchocarpus floribundus* Benth.) no controle do pulgão-preto dos citros e verificou que a aplicação dos extratos etanólicos, na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , controlou mais de 50% a população do inseto. Os extratos aquosos de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e de erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* A. St.-Hil.) provocaram 100% de mortalidade do pulgão-preto apenas na concentração de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  (Gonzaga et al., 2008). Além disso, outros estudos apontam o controle de insetos-pragas por extratos botânicos nas concentrações letais medianas ( $CL_{50}$ ) variando de  $0,45$  a  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  (Silva et al., 2007; Cruz-Estrada et al., 2013; Mungenge et al., 2014). No presente trabalho, a  $CL_{50}$  das frações de *S. saponaria* sobre adultos e ninfas de *T. citricidus* ocorreram em valores de até  $0,84 \text{ mg mL}^{-1}$ . Isso mostra que as frações foram efetivas em baixas concentrações e que *S. saponaria* pode ser uma espécie doadora de compostos com potencial inseticida.

A toxidade via contato direto dos derivados botânicos pode ocorrer através da asfixia, bloqueando os espiráculos do inseto ou pelo rompimento de ceras cuticulares e membranas no tegumento, levando à desidratação (Isman, 2006). O modo de ação pode estar diretamente relacionado com a inibição da acetilcolinesterase (Viegas Júnior, 2003). A acetilcolina deve ser removida da fenda sináptica por meio de uma hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase. Caso isso não aconteça, ocorre o acúmulo do neuro-transmissor na fenda, impedindo uma transmissão correta

do potencial de ação, que pode levar o inseto à morte por falência respiratória (Chambers e Carr, 1995; Knaak e Fiuza, 2010).

Tabela 3. Coeficiente angular, concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, em mg mL<sup>-1</sup>) e intervalo de confiança das frações de hexano e acetato de etila de folhas de *Sapindus saponaria* para adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* após 48 horas de aplicação das soluções.

Estágio	Coeficiente angular ( $\pm$ EP) <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (IC) <sup>b</sup>		CL <sub>90</sub> (IC) <sup>b</sup>	$\chi^2$ ( <sup>c</sup> )
		Hexano			
Adulto	2,55 $\pm$ 0,32	0,51 (0,42 - 0,59)		1,61 (1,33 - 2,12)	47,49
Ninfa	5,48 $\pm$ 1,17	0,25 (0,18 - 0,30)		0,63 (0,52 - 0,85)	24,46
Acetato de Etila					
Adulto	2,51 $\pm$ 0,27	0,84 (0,72 - 0,97)		2,72 (2,20 - 3,60)	23,73
Ninfa	1,95 $\pm$ 0,33	0,26 (0,17 - 0,35)		1,19 (0,94 - 1,66)	40,89

<sup>a</sup> EP: erro padrão da média. <sup>b</sup> IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro. <sup>c</sup>  $\chi^2$ : valor de qui-quadrado calculado.

Infelizmente, os fitoinseticidas constituem apenas 1% do mercado mundial de inseticidas (Isman, 2006). Isto pode ser um reflexo de algumas barreiras para a comercialização de inseticidas vegetais que impossibilitam sua maior participação no mercado de insumos agrícolas. Entre as limitações estão a escassez de recursos vegetais, a falta de padronização e de controle de qualidade das formulações, fatores estes que dificultam o registro desses fitoquímicos. No entanto, isso não tem impedido a busca de novos inseticidas vegetais, principalmente devido à grande variedade de substâncias presentes em toda a flora mundial, que se configura como um forte atrativo para novas pesquisas na área de controle de insetos (Viegas-Junior, 2003; Krinski et al., 2014). Todavia, como os fitoinseticidas são provenientes de recursos renováveis e possuem uma mistura de vários compostos ativos que agem sinergicamente, estes fitoquímicos ainda devem ser mais bem estudados, visando conhecer seu potencial também sobre outros organismos que não seriam o alvo do controle (Barreto, 2005).

Dessa forma, os resultados do presente trabalho mostram a elevada atividade inseticida da fração hexânica oriunda do extrato etanólico foliar de *S. saponaria* sobre os afídeos de *T. citricidus*. Ações inseticidas dessa espécie de planta também foram descritas para outros insetos alvo (Boiça Júnior et al., 2005; Barreto et al., 2006; Santos et al., 2008; Porras e Lopez-Avila, 2009; Jesus et al., 2011); porém, foi a primeira vez que se relatou o efeito inseticida de *S. saponaria* sobre o pulgão-preto dos citros.

### 3.3. Fracionamentos e identificação dos metabólitos secundários

Com base nos resultados dos bioensaios, a fração hexânica foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna, obtendo-se um total de 31 frações. Considerando-se o rendimento e a pureza da amostra, cinco frações (F5, F6, F7, F8 e F11) foram selecionadas e suas atividades biológicas foram avaliadas sobre coleóptilos de trigo. Todas as frações analisadas apresentaram efeito inibitório significativo em relação ao controle negativo (Figura 8). Na concentração 0,8 mg mL<sup>-1</sup>, os coleóptilos de trigo com menores comprimentos foram registrados para o herbicida (4,46 mm), seguido das frações 8 (5,23 mm) e 5 (5,93 mm). Na concentração 0,4 mg mL<sup>-1</sup>, o herbicida (4,98 mm) e a fração 8 (6,27 mm) apresentaram maior atividade inibitória sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo; enquanto na concentração 0,2 mg mL<sup>-1</sup>, não houve diferença entre as frações (Tabela 4).

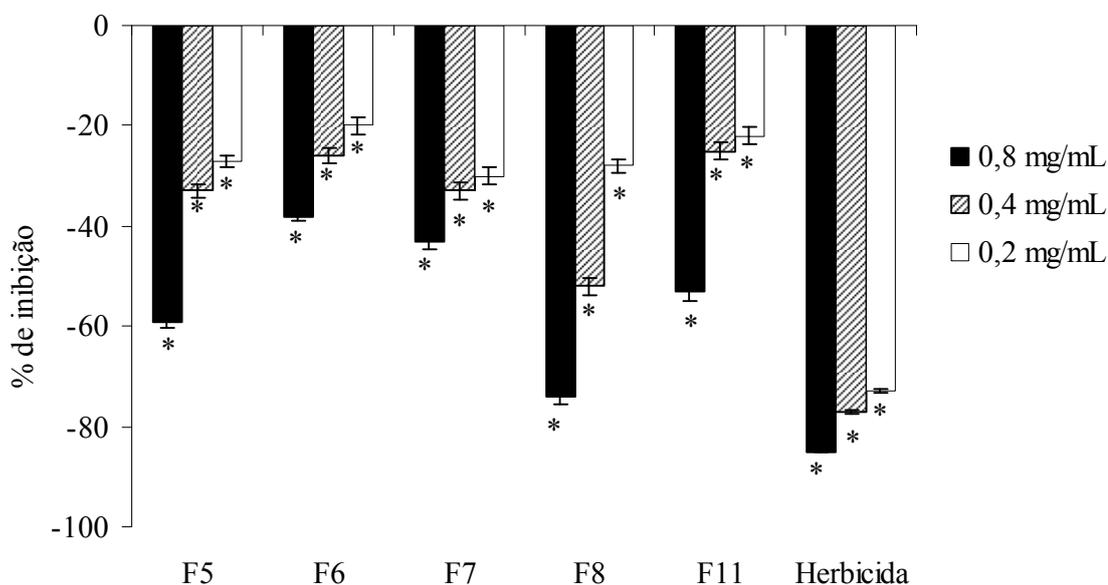


Figura 8. Efeito inibitório das sub-frações da fração hexânica de folhas de *Sapindus saponaria* e do herbicida oxifluorfen sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Diferença significativa em relação ao controle negativo.

De acordo com a análise de RMN <sup>1</sup>H e com os resultados obtidos no bioensaio, a fração F8 (0,6983 g) foi submetida a outro fracionamento para purificação e identificação dos compostos presentes. Os dados espectroscópicos indicaram que as sub-frações F8D (V) (Figuras 9, 1S-3S), F8F (I) (Figuras 10, 4S-6S), F8F (II) (Figuras 9, 7S-9S) e F8F (V) (Figuras 11, 10S-12S) podem ser compostas por flavonóis, como caempferol e quercetina, com diferentes grupos funcionais. As propostas dessas estruturas foram realizadas por análise espectroscópica em comparação com os dados da literatura (Nookandeh et al., 2004; Lee et al., 2008).

Tabela 4. Comprimento médio dos coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação do herbicida e das sub-frações da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações.

Sub-frações	Comprimento (mm)			
	0.8 mg mL <sup>-1</sup>	0.4 mg mL <sup>-1</sup>	0.2 mg mL <sup>-1</sup>	Controle
5	5,93 ± 1,23 Bb	7,17 ± 1,20 Aab	7,40 ± 1,20 Aab	8,66 ± 1,28 a
6	6,90 ± 0,79 Ab	7,47 ± 1,18 Ab	7,77 ± 1,05 Aab	8,66 ± 1,28 a
7	6,67 ± 1,14 Ab	7,10 ± 1,24 Ab	7,30 ± 1,01 Aab	8,66 ± 1,28 a
8	5,23 ± 1,17 Bcb	6,27 ± 1,02 ABab	7,37 ± 1,14 Aab	8,66 ± 1,28 a
11	6,20 ± 1,28 ABb	7,50 ± 1,17 Aab	7,63 ± 1,24 Aab	8,66 ± 1,28 a
Herbicida	4,46 ± 0,23 Cb	4,98 ± 0,32 Bb	5,13 ± 0,40 Bb	8,66 ± 1,28 a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as sub-frações e minúsculas para as diluições, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

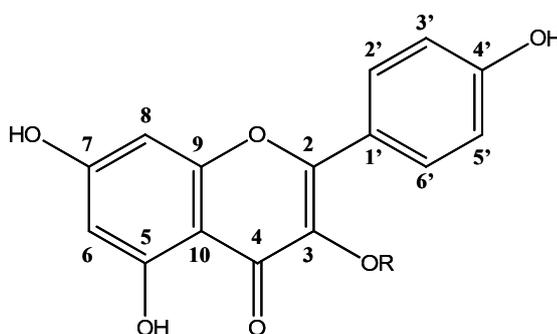


Figura 9. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir das sub-frações F8D (V) e F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol caempferol.

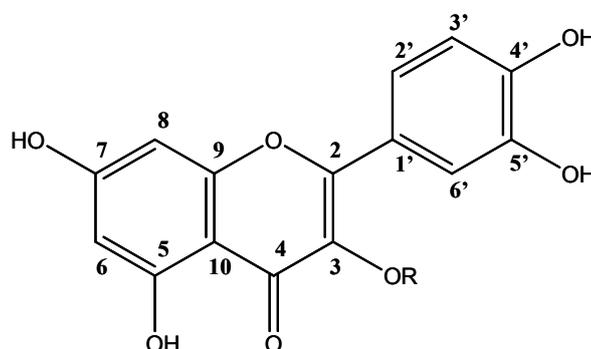


Figura 10. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol quercetina.

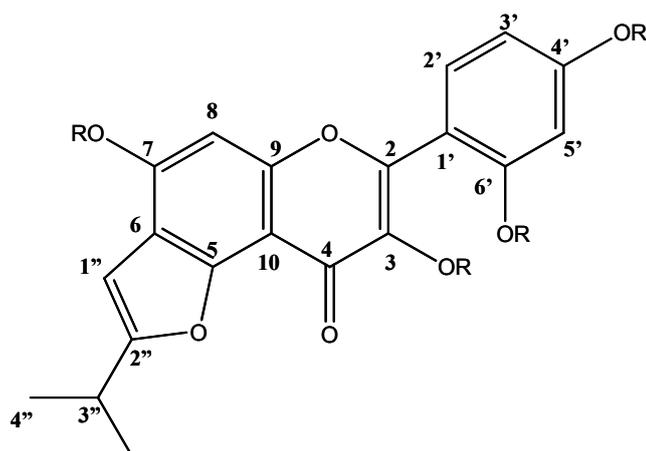


Figura 11. Proposta da estrutura química do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*. Estrutura base do flavonol 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona.

Caempferol e quercetina são flavonóides naturais com muitas atividades biológicas associadas (Hong et al. 2009; Céspedes et al., 2014), podendo ser facilmente utilizada em produtos comerciais (Park et al., 2006). A potencialidade dessas substâncias como aleloquímico já foi registrada para as folhas de *Melilotus neapolitana* Ten. (Esposito et al., 2008), *Lobularia maritima* (L.) Desv. (Fiorentino et al., 2009), *Senna alata* (L.) Roxb. (Rodrigues et al., 2010) e de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. (Imatomi et al., 2013). Na literatura há alguns registros da presença de flavonóides em extratos foliares de *S. saponaria* (Wahab e Selim, 1985; Castro et al., 1999; Rashed et al., 2013); porém, poucos trabalhos relataram a presença do caempferol e quercetina nas folhas desta espécie. No entanto, estudos mostram que os flavonóides do tipo caempferol e quercetina glicosilados já foram isolados em outras espécies da família Sapindaceae (Niu et al., 2010; Teffo et al., 2010, Díaz e Rossini, 2012).

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos nos vegetais e apresentam grande diversidade de atividades biológicas, incluindo antioxidante (Wolfe e Liu, 2008), alelopática (Treutter, 2006; Perry et al., 2007; Simões et al., 2008; Silva et al., 2013), gastroprotetor (Mota et al., 2009), anticancerígeno (Benavente-García e Castillo, 2008; Pick et al., 2011; Rashed et al., 2013), anti-inflamatório (Kim et al., 2004; García-Lafuente et al., 2009) e antimicrobiana (Cushnie e Lamb, 2011; Salas et al., 2011).

Os flavonóides são conhecidos por exibir uma ampla variedade de funções na fisiologia, bioquímica e ecologia dos vegetais (Taylor e Grotewold, 2005; Weston e Mathesius, 2013). Na literatura, muitos flavonóides são caracterizados como aleloquímicos, atuando como reguladores de crescimento das plantas (Treutter, 2006; Cesco et al., 2012; Yan et al., 2014; Nebo et al., 2014). Como exemplos desse efeito, temos as flavonas isoladas das plântulas de arroz que reduziram

significativamente o crescimento de *Cyperus difformis* L. e *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Kong et al., 2007). Os flavonóides quercetina, rutina e apigenina de *Castanea sativa* Mill. também inibiram a germinação de sementes e o desenvolvimento do epicótilo e raízes de *Raphanus sativus* L. (Basile et al., 2000). O estudo químico de frações ativas do extrato de *Festuca arundinacea* Schreb. revelou a presença de flavonóis e flavonóis glicosilados derivados de quercetina, caempferol e isorhamenitina, além da presença de alcalóides pirrolizidínicos (Bertoldi et al., 2012). Os flavonóides da raiz de *Stellera chamaejasme* L. registraram efeito fitotóxico sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Yan et al., 2014). A flavona e o 3',4'-metilenodioxo-5,7-dimethoxyflavone isolados, respectivamente, de *Cipadessa fruticosa* Bl. e *Neoraputia magnifica* (Engl.) Emmerich inibiram mais de 75% o alongamento dos coleótilos de trigo, sendo que este último também reduziu fortemente o crescimento das plântulas de *Lepidium sativum* L. (Nebo et al., 2014).

Os efeitos desses compostos em plantas incluem a diminuição da entrada de oxigênio nas mitocôndrias e nos cloroplastos, a redução do transporte de elétron e a eficiência do fotossistema II (Einhellig, 2004). Essas múltiplas atividades resultam em amplo espectro de fitotoxicidade (Einhellig, 2004) ou, dependendo da concentração dos flavonóides, estimulam o crescimento de raízes (Macías et al., 1997). De modo geral, os flavonóides protegem as células do estresse oxidativo pela quelação, inativação ou captação de radicais livres, produzidos pelo sistema de transporte de elétrons (Harbone, 1994). Devido as suas características químicas, capazes de captar elétrons, atuam como catalisadores na fase fotoquímica da fotossíntese e/ou como reguladores de canais iônicos envolvidos na fosforilação oxidativa do processo de obtenção de energia fotossintética (Pietá e Simonetti, 1999). Em função dessas características químicas, os flavonóides estão envolvidos com os processos relacionados à absorção iônica que prejudicam o padrão de despolarização das membranas celulares das raízes, levando a disfunção no equilíbrio de íons (Parvez et al., 2004). Os danos metabólicos acarretados pelos flavonóides, segundo Macías et al. (1997), dependem da estereoquímica das moléculas e concentração utilizada, as quais podem promover ou inibir o crescimento das raízes.

Assim, pode-se dizer que os flavonóides influenciam na regulação da atividade enzimática, no transporte de auxina e na formação de espécies reativas de oxigênio (Taylor e Grotewold, 2005; Peer e Murphy, 2007; Naoumkina e Dixon, 2008; Weston e Mathesius, 2013). Essas alterações na fisiologia vegetal modificam a arquitetura da planta como um todo, interferindo no crescimento da raiz e da parte aérea, na resposta gravitrópica (Buer e Djordjevic 2009), no número de ramificações, flores e na estatura (Buer et al., 2010; Imatomi et al., 2013). Os mecanismos pelos quais as alterações nos níveis de flavonóides promovem essas alterações fisiológicas ainda não são bem definidos (Imatomi et al., 2013). Buer et al. (2010) relatam três possíveis modos de ação: efeito

direto dos flavonóides sobre a molécula-alvo não identificada; efeito indireto, mediado pela habilidade dos flavonóides em modular os níveis de auxina; ou por meio da regulação de espécies reativas de oxigênio.

Além do efeito bioherbicida, a atividade inseticida dos flavonóides também tem sido registrada por diversos autores (Schaller, 2008; Castillo et al., 2013). Como exemplo, pode-se citar as flavonas isoladas de *Gnaphalium affine* D. Don. (Asteraceae), as quais foram tóxicas para *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Morimoto et al., 2003); os flavonóides isoméricos das folhas de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) que reduziram significativamente o peso (58,5%) e o crescimento das larvas (50,0%) de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Anshul et al., 2013); e o caempferol isolado do extrato metanólico de *Cacalia tangutica* (Maxim.) Hand.-Mazz. que provocou a mortalidade dos adultos de *Musca domestica* (77,04%) e das larvas de *Aedes albopictus* (71,06%) (Huang et al., 2012).

Dessa maneira, a significativa atividade biológica da fração hexânica, tanto sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo, quanto na mortalidade do pulgão-preto dos citrus, pode ser atribuída pela presença de flavonóis derivados do caempferol e quercetina identificados nessa fração. No entanto, outros estudos são necessários para isolar e identificar outros metabólitos biologicamente ativos.

#### 4. Conclusão

A fração hexânica proveniente do extrato etanólico de folhas de *S. saponaria* apresentou efeito fitotóxico sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo e ocasionou elevada mortalidade sobre ninfas e adultos de *T. citricidus*. As principais substâncias identificadas nessa fração foram os flavonóis derivados do caempferol e quercetina, e estes podem estar envolvidos na atividade biológica observada. Assim, *S. saponaria* pode ser uma espécie doadora de compostos com potencial inseticida e herbicida, sendo uma boa candidata para o fornecimento de aleloquímicos para uso futuro na agricultura.

#### 5. Referências

ALBIERO, A.L.M.; BACCHI, E.M.; MOURAO, K.S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiarum*, v. 23, n.2, p. 549-560, 2001.

ANESE, S. **Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis* Miers e identificação de compostos com atividade fitotóxica e inseticida.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ANSHUL, N.; BHAKUNI, R.S.; GAUR, R.; SINGH, D. Isomeric flavonoids of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) as insect growth inhibitors against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, 897-903, 2013.

ATKINS, E.L.; GERYWOOD, E.; MACDONALD, R.L. **Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees.** Laboratory studies. Davis, University of California, 36p, 1973.

BALFOUR A., KHAN, A. Effects of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas on *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae) and its Parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Braconidae). **Plant Protection Science**, v. 48, p. 123-130, 2012.

BARRETO, C.F. *Aedes aegypti*: Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, p.62-73, 2005.

BARRETO, C.F.; CAVASIN, G.M.; SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.

BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; CASTALDO, C.R.; VUOTTO, M.L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 110-116, 2000.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of Citrus Flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BERTOLDI, C.; LEO, M.; ERCOLI, L.; BRACA, A. Chemical profile of *Festuca arundinacea* extract showing allelochemical activity. **Chemoecology**, v. 22, n. 1, p. 13-21, 2012.

BOIÇA JÚNIOR, A.L.; MEDEIROS, C.A.M.; TORRES, A.L.; CHAGAS FILHO, N.R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 45-50, 2005.

BUER, C.S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M.A. Flavonoids: New roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 98-111, 2010.

CASTILLO, L.; DÍAZ, M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ROSSIN, C. Differential activity against aphid settling of flavones obtained from *Clytostoma callistegioides* (Bignoniaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 44, n. 618-621, 2013.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v. 47, n. 3, p. 605-616, 1999.

CESCO, S.; MIMMO, T.; TONON, G.; TOMASI, N.; PINTON, R.; TERZANO, R.; NEUMANN, G.; WEISSKOPF, L.; RENELLA, G.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Plant-borne flavonoids

released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 123-149, 2012.

CÉSPEDES, C.L.; SALAZAR, J.R.; ARIZA-CASTOLO, A.; YAMAGUCHI, L.; ÁVILA, J.G.; AQUEVEQUE, P.; KUBO, I.; ALARCÓN, J. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. **Environmental Research**, v. 132, p. 391-406, 2014.

CHAMBERS, J.E.; CARR, R.L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. **Toxicology**, v. 105, p. 291-304, 1995.

COELHO, A.A.M; PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 1, p. 133-138, 2006.

CORREIA, R.S. **Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus fluribundus* Benth. (Timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (pulgão-preto dos citros) (Sternorrhyncha: Aphididae)**. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA/UFAM, Manaus-AM. 2006.

CRUZ-ESTRADA, A.; GAMBOA-ANGULO, M.; BORGES-ARGÁEZ, R.; SÁNCHEZ, E.R. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroidea). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-9, 2013.

CUBILLO, D.; SANABRIA, G.; HIJE, L. Mortalidade de adultos de *Bemisia tabaci* com extractos de hombre grande (*Quassia amara*). **Manejo Integrado de Plagas**, v. 45, p. 25-29, 1997.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.

CUTLER, S.J.; HOAGLAND, R.E.; CUTLER, H.G. Evaluation of selected pharmaceuticals as potential herbicides: Bridging the gap between agrochemicals and pharmaceuticals, pp. 129–137, in S.S. Narwal, R.E. Hoagland, R.H. Dilday, and M.J.R. Reigosa (eds.). **Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry**, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2000.

DÉLA, M.A.; KOFFIVI, K.G.; KOMINA, A.; ARNAUD, A.; PHILIPPE, G.; ADOLÉ, G.I. Evaluation of neem leaves-based preparations as insecticidal agents against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 17, p. 1344-1352, 2014.

DÍAZ, M.; ROSSINI, C. Bioactive natural products from Sapindaceae deterrent and toxic metabolites against insects. **Insecticides - Pest Engineering**, Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, InTech, 2012.

EINHELLIG, F.A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS, F.A. et al. (Eds.) **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004, p.217-238.

ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; IZZO, A.; CEFARELLI, G.; GOLINO, A.; MONACO, P. Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of Mediterranean herbaceous plant community. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, n. 3, p. 199-210, 2008.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; LIMA, A.P.; ARGOLO, V.M. Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné). Embrapa Acre. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 37, 42 p., 2002.

FERREIRA, D.F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

FIorentino, A.; Ricci, A.; D'ABROSCA, B.; GOLINO, A.; IZZO, A.; PASCARELLA, M.T.; PICCOLELLA, S.; ESPOSITO, A. Kaempferol glycosides form *Lobularia maritima* and their potential role in plant interactions. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 204-217, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq., 2002, 920pp.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GONZAGA, A.D.; GARCIA, M.V.B.; SOUSA, S.G.A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R.S.; RIBEIRO, J.D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcegravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazônica**, v. 38, p.101-106, 2008.

GRAVENA, S. O pulgão e a morte súbita dos citros. **Coopercitrus Informativo Agropecuário**, v. 17, n. 197, p. 26, 2003.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; MARQUES, F.A.; SANTOS, K.C.; FORIM, M.R. Activity of fractionated extracts of *Sapindus saponaria* L. leaves on the elongation of wheat coleoptiles. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 42, n.1, p. 50-55, 2014.

GUERREIRO, J.C.; BUENO, P.R.R.; FILHO BERTI, E.; BUSOLI, A.C. Ocorrência estacional das principais espécies de Coccinellidae predadores de *Toxoptera citricida* nos citros. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, ano IV, n. 07, p. 1-14, 2005.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**, London: Chapman & Hall, 1994, p.589-618.

HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. Bioassays-useful tools for the study of allelopathy, pp. 315-351, in F. A. Macías et al. (eds.). **Allelopathy, Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, Boca-Raton, FL, 2004.

HONG, J.T.; YEN, J.H.; WANG, L.; LO, Y.H.; CHEN, Z.T.; WU, M.J. Regulation of hemeoxygenase-1 expression and MAPK pathway sin response to kaempferol and rhamnocitrinin PC12cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 59-68, 2009.

HUANG, J.G.; ZHAO, H.H.; MIAO, H.; XU, H.H. Insecticidal activities and active ingredients of *Cacalia tangutica* against *Musca domestica* and *Aedes albopictus*. **Acta Entomologica Sinica**, v. 55, n. 12, p. 1355-1361, 2012.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A.P.; GUALTIERI, S.C.J.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated

- from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, 2013.
- ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.
- JESUS, F.G.; PAIVA, L.A.; GONÇALVES, V.C.; MARQUES, M.A.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Efeito de plantas inseticidas no comportamento e biologia de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 279-285, 2011.
- KHALIQ, A., MATLOOB, A., KHAN, M.B., TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.
- KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.
- KNAAK, N.; FIÚZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.
- KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Editora Rigel. 446pp, 1994.
- KONG, C.H.; ZHAO, H.; XU, X.H.; WANG, P.; GU, Y. Activity and allelopathy of soil of flavone O-glycosides from rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6007-6012, 2007.
- KÖPPEN, W. **Climatologia: com um estúdio de los climas de la tierra**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948.
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Edição especial**, v. 36, p. 225-242, 2014.
- LAGUNES, T.A.; RODRÍGUEZ, H.C. **Los extractos acuosos vegetales con actividad insecticida: el combate de la conchuela del frijol**. Texcoco: USAID-CONACYT-SMECP, 1992. 57p. (Temas Selectos de Manejo de Insecticidas Agrícolas, 3).
- LEE, E.; MOON, B.H.; PARK, Y.; HONG, S.; LEE, S.; LEE, Y.; LIM, Y. Effects of hydroxy and methoxy substituents on nmr data in flavonols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 507-510, 2008.
- LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Potencialidade do óleo de laranja no controle do pulgão preto dos citros. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 23-26, 2009.
- MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v. 45, p. 683-687, 1997.
- MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2512-2521, 2000.
- MACÍAS, F.A.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. **Steroids**, v. 7, p. 603-608, 2006.

- MACÍAS, F.A.; LACRET, R.; VARELA, R.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J.M.G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.
- MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, p. 95-112, 2012.
- MORDUE, A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal Insect of Physiology**, v. 39, n. 11, p. 903-924, 1993.
- MORIMOTO, M.; TANIMOTO, K.; NAKANO, S.; OZAKI, T.; NAKANO, A.; KOMAI, K. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 389-393, 2003.
- MOTA, K.S.L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.
- MUNGENCE, C.; ZIMUDZI C.; ZIMBA, M.; NHIWATIWA, T. Phytochemical screening, cytotoxicity and insecticidal activity of the fish poison plant *Synaptolepis alternifolia* Oliv.(Thymelaeaceae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p. 15-19, 2014.
- NAOUMKINA, M.; DIXON, R.A. Subcellular localization of flavonoid natural products: A signalling function? **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p. 573-575, 2008.
- NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE, J.E.L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.1, p.1-6, 2009.
- NEBO, L.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226-232, 2014.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; PEREIRA, F.C; KALAKI, R.B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Editora Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, SP, 2010, 137 p.
- NOOKANDEH, A.; FRANK, N.; STEINER, F.; ELLINGER, R.; SCHNEIDER, B.; GERHÄUSER, C.; BECKER, H. Xanthohumol metabolites in faeces of rats. **Phytochemistry**, v. 65, p. 561-570, 2004.
- NICULAU, E.S.; ALVES, P.B.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S.; MATOS, A.P.; BERNARDO, A.R.; VOLANTE, A.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; CORRÊA, A.G.; BLANK, A.F.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, L.P. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.
- NIU, H.M.; ZENG, D.Q.; LONG, C.L.; PENG, Y.H.; WANG, Y.H.; LUO, J.F.; WANG, H.S.; SHI, Y.N.; TANG, G.H.; ZHAO, F.W. Clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2010.

- PARK, J.S.; RHO, H.S.; KIM, D.E.; CHANG, I.S. Enzymatic preparation of kaempferol from Green tea seed and its antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2951-2956, 2006.
- PARVEZ M.M.; TOMITA-YOKOTANI, K.; FUJII, Y.; KONISHI, T.; IWASHINA, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 7, p. 631-635, 2004.
- PAVELA, R.; BARNET, M.; KOCOUREK, F. Effect of azadirachtin applied systemically through roots of plants on the mortality, development and fecundity of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). **Phytoparasitica**, v. 32, n. 3, p. 286-294, 2004.
- PEER, W.A.; MURPHY, A.S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Sciences**, v. 12, p. 556-563, 2007.
- PERRY, L.G.; THELEN, G.C.; REDENOUR, W.M.; CALLAWAY, R.M.; PASCHKE, M.W.; VIVANCO, J.M. Concentrations of the allelochemical (+)-catechin in *Centaurea maculosa* Soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 2337-2344, 2007.
- PELEGRINI, D.D.; TSUZUKI, J.K.; AMADO, C.A.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.
- PICK, A.; MULLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I.K.; WEIGHT, M.; BÖNISCH, H.; MÜLLER, C.E.; WIESE, M. Structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2090-2102, 2011.
- PIETTA, P.G.; SIMONETTI, P. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999, p.283-308.
- PIMENTEL-GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 477p.
- PORRAS, M.F.; LOPEZ-AVILA, A. Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 35, n. 1, p. 7-11, 2009.
- RASHED, K.N.; CIRIC, A.; GLAMOCLJIA, J.G.; CALHELHA, R.C.; FERREIRA, I.C.F.R.; SOKOVIC, M. Antimicrobial activity, growth inhibition of human tumour cell lines, and phytochemical characterization of the hydromethanolic extract obtained from *Sapindus saponaria* L. aerial parts. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- REGNAULT-ROGER, C. The potencial of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, p. 25-34, 1997.
- RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.J. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2010.

- ROEL, A.R.; JOSÉ DJAIR VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, v. 59, n. 1, p. 53-58, 2000.
- SALAS, M.P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S.L. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1411-1415, 2011.
- SANTOS, W.L.; FREIRE, M.D.M.; BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; MACEDO, M.L.R. Effect of the aqueous extracts of the seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on fall armyworm. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 373-383, 2008.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 2, p. 217-297, 1990.
- SCHALLER, A. **Induced plant resistance to herbivory**. Hardcover: Springer, 2008. 464 p.
- SILVA, E.A.S.; LÔBO, L.T.; SILVA, G.A.; SOUZA FILHO, A.P.S.; SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, M.S.P. Flavonoids from leaves of *Derris urucu*: assessment of potential effects on seed germination and development of weeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 881-889, 2013.
- SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.M.E.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 293-298, 2007.
- SIMÕES, K.; DU, J.; KRETZCHMAR, F.S.; BROECHLING, C.D.; STERMITZ, F.S.; VIVANCO, J.M.; BRAGA, M.R. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 681-687, 2008.
- SOUZA, A.P. **Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) biótipo B**. 2004. 101f. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- SOUZA, M.C.; CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GIANCOTTI, P.R.F. Allelopathy in pigweed (a review). **Communications in Plant Sciences**, v. 1, p. 5-12, 2011.
- TANG, C.S.; YANG, R.Z. Plants used for pest control in China: a literature review. **Economic Botany**, v. 42, n. 3, p. 376-406, 1988.
- TANG, Y.Q.; WEATHERSBEE, A. A.; MAYER, R.T. Effect of neem seed extract on the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) and its parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae). **Environmental Entomology**, v. 31, n. 1, p. 172-176, 2002.
- TAYLOR, L.P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 317-323, 2005.
- TEFFO, L.S.; ADEROGBA, M.A.; ELOFF, J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 1, p. 25-29, 2010.

- TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147-157, 2006.
- TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, 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 and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.
- VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n.3, p.390-400, 2003.
- WAHAB, S.M.A.; SELIM, M.A. Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v. 56, p. 167-168, 1985.
- WESTON, L.A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 283-297, 2013.
- WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8404-8411, 2008.
- YAN, Z.; GUO, H.; YANG, J.; LIU, Q.; JIN, H.; XU, R.; CUI, H.; QIN, B. Phytotoxic flavonoids from roots of *Stellera chamaejasme* L.(Thymelaeaceae). **Phytochemistry**, v. 106, p. 61-68, 2014.

## **Informação Suplementar - Anexos**

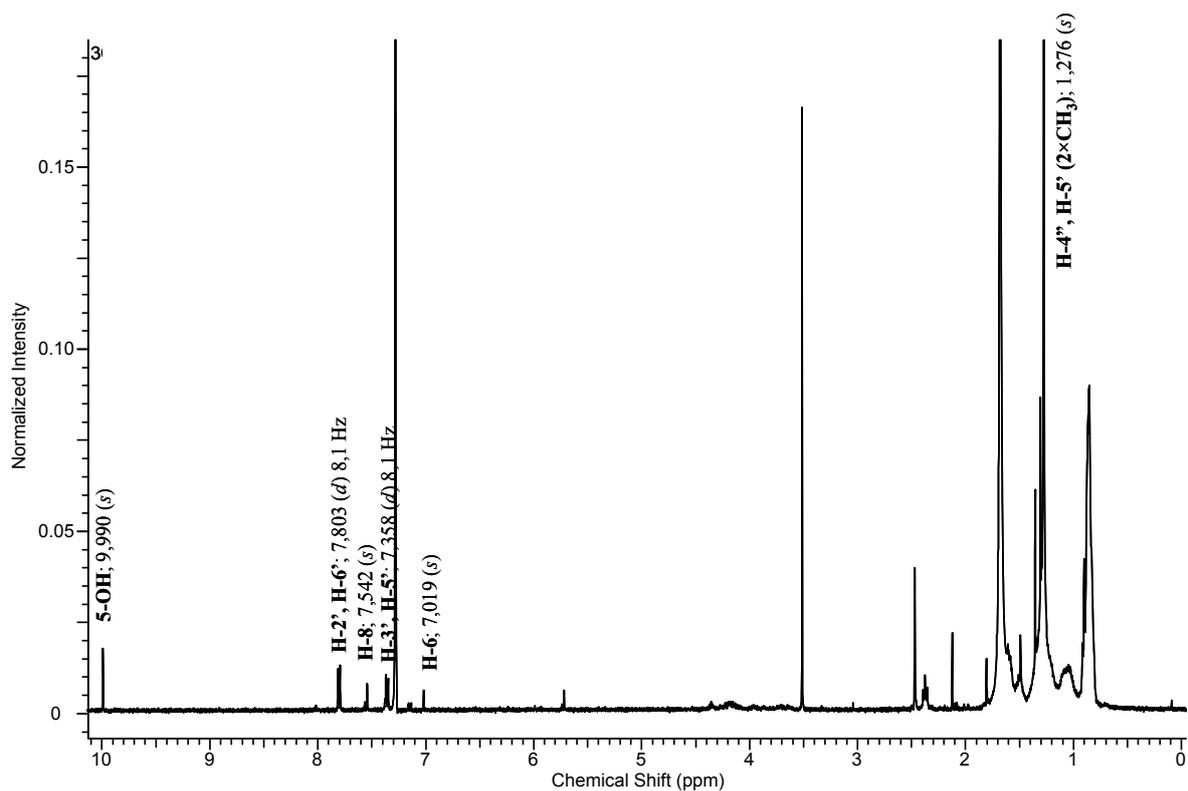


Figura 1S. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

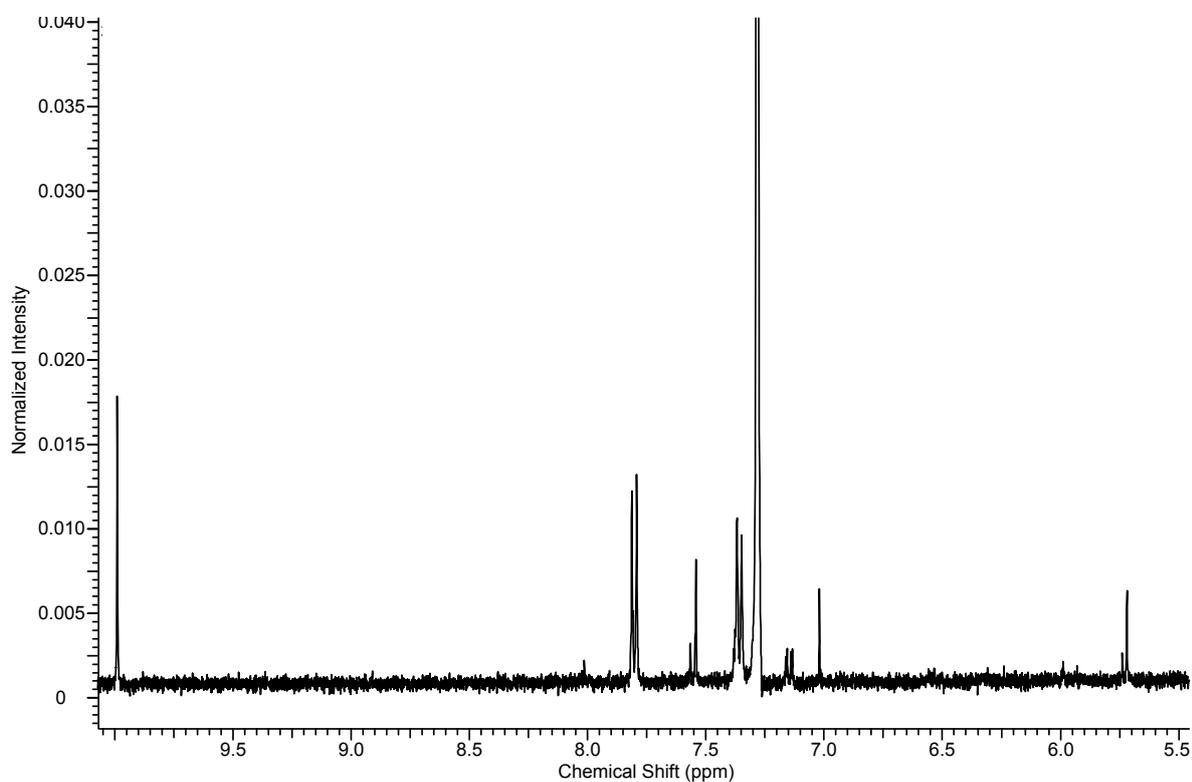


Figura 2S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 5,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

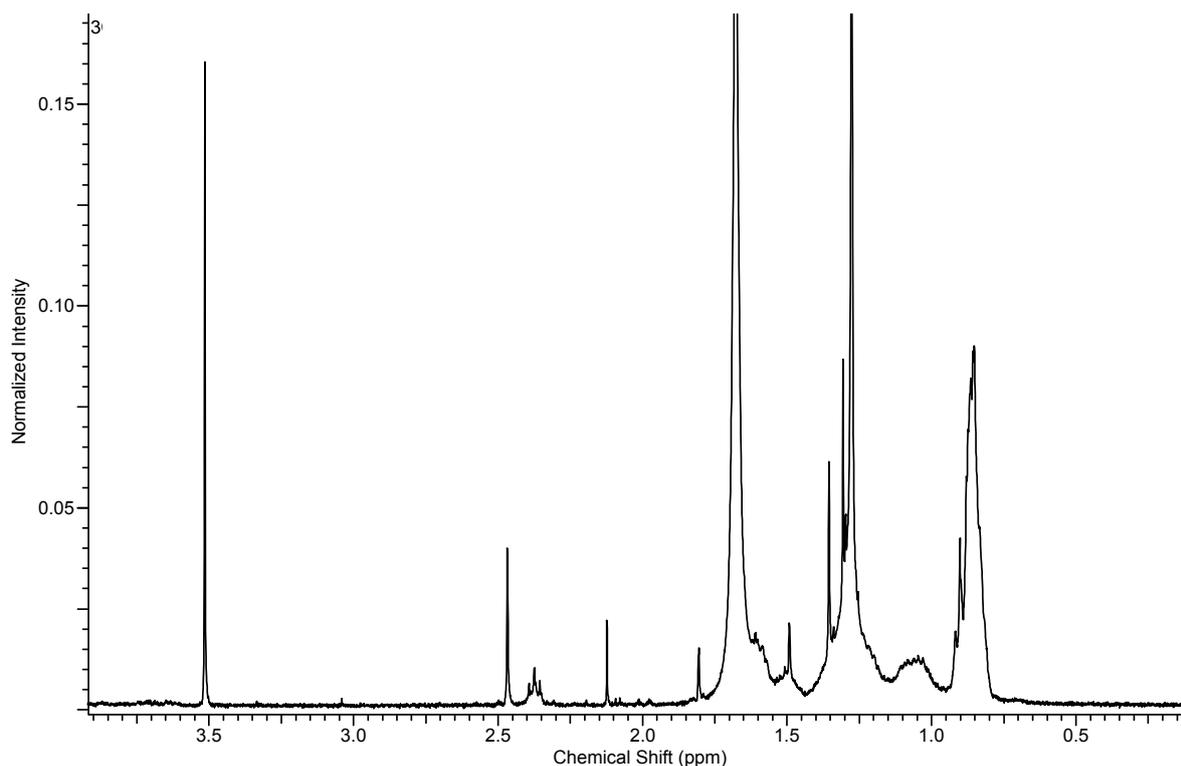


Figura 3S. Ampliação do espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8D (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

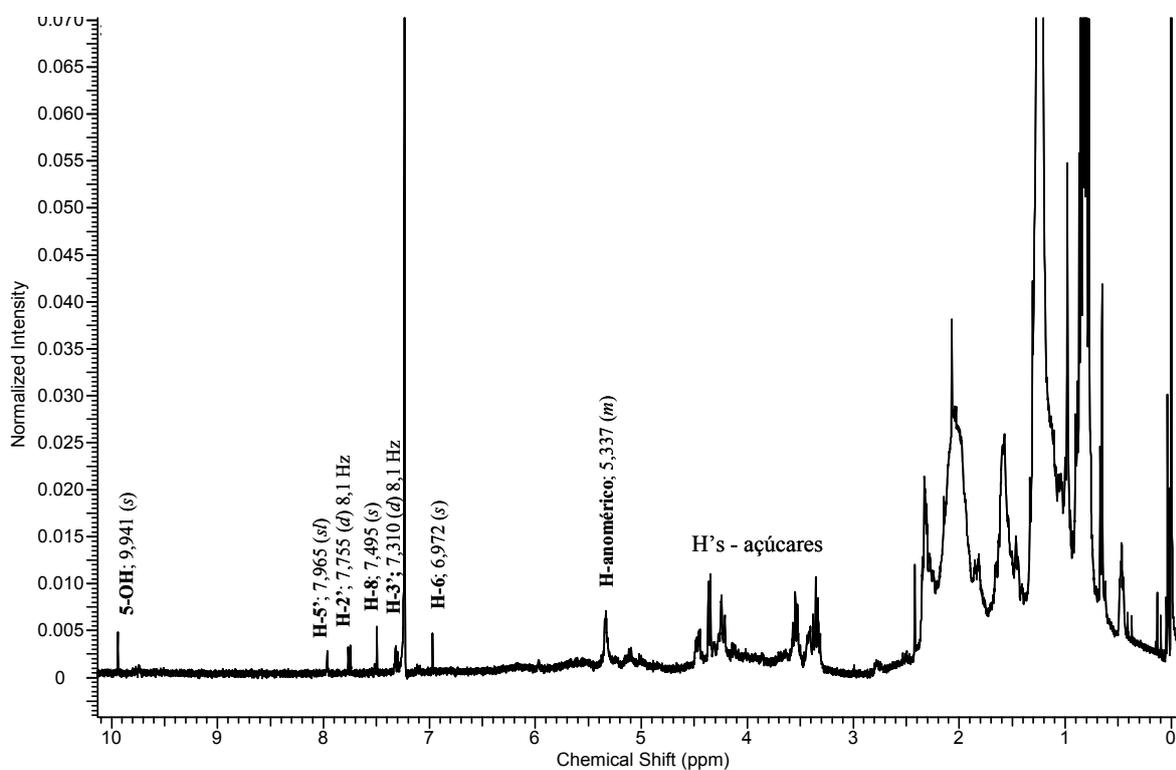


Figura 4S. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

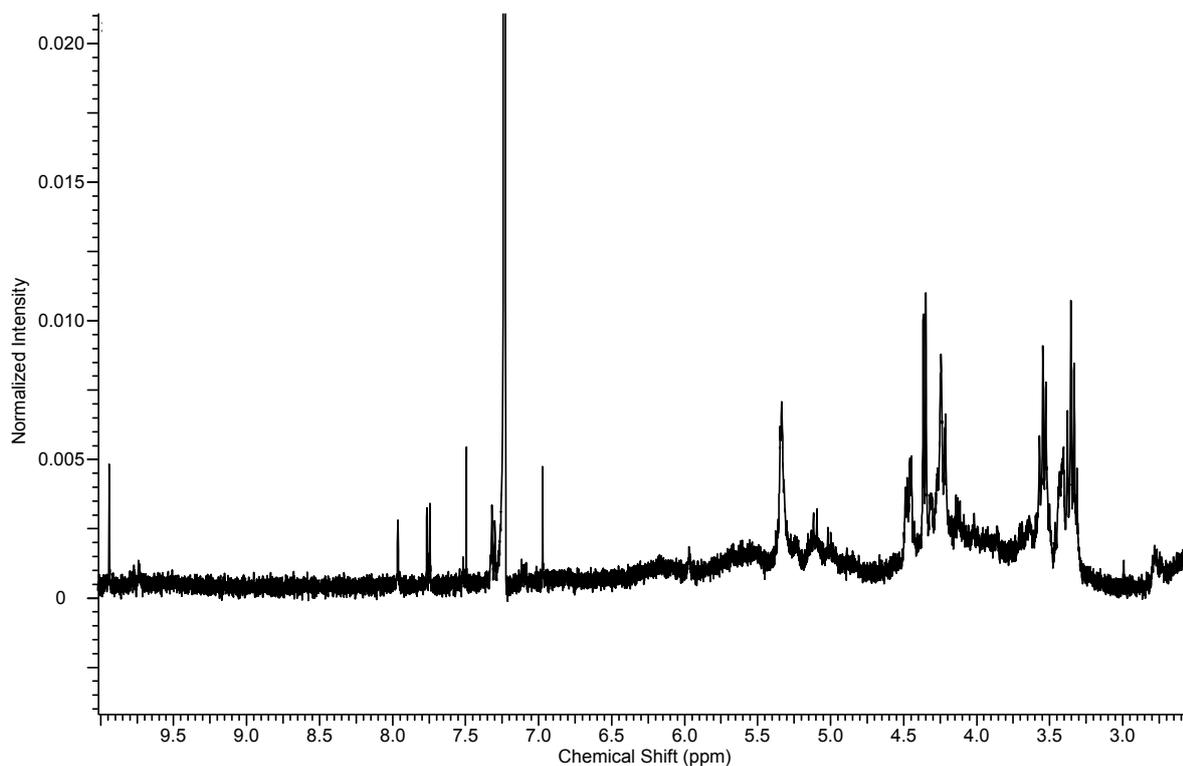


Figura 5S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 2,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

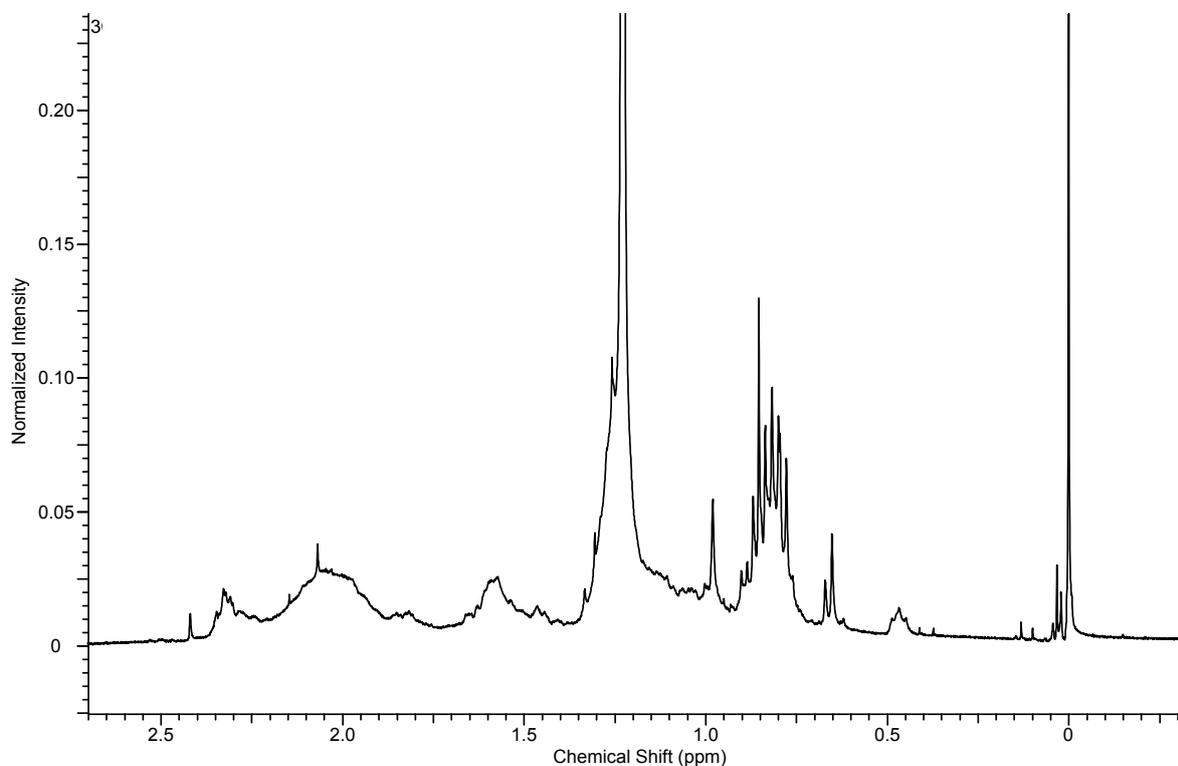


Figura 6S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 0 e 3,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (I) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

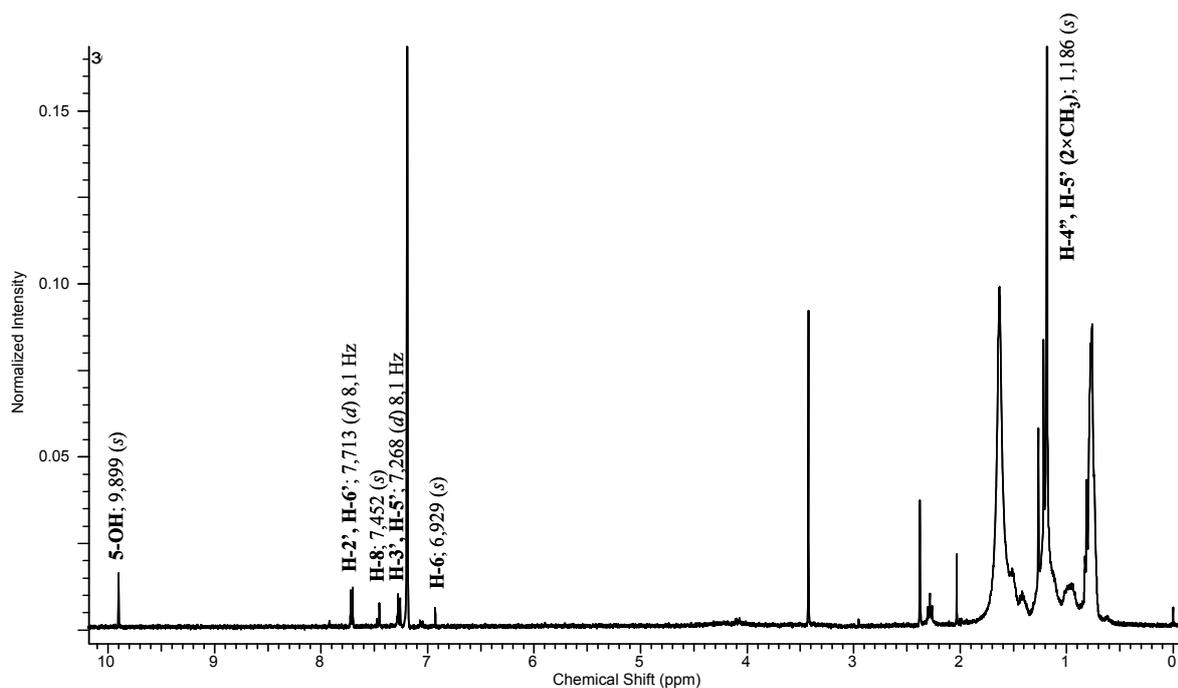


Figura 7S. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

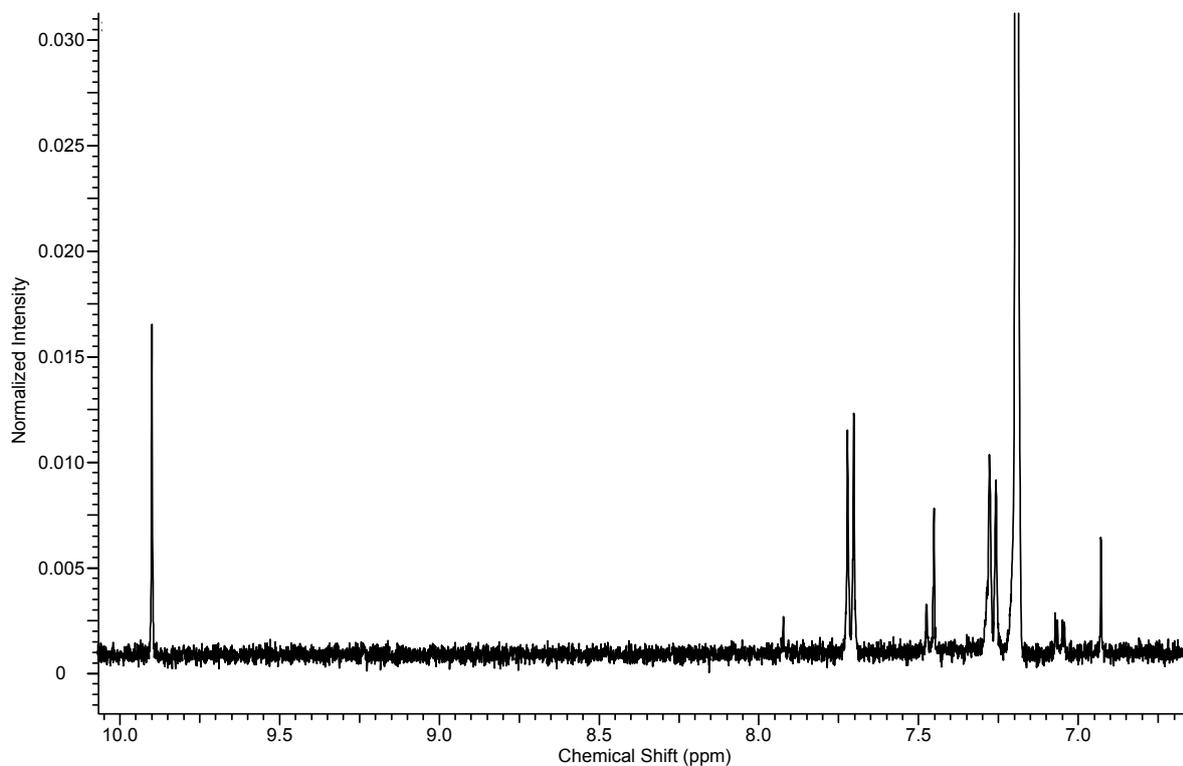


Figura 8S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 6,5 e 10,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

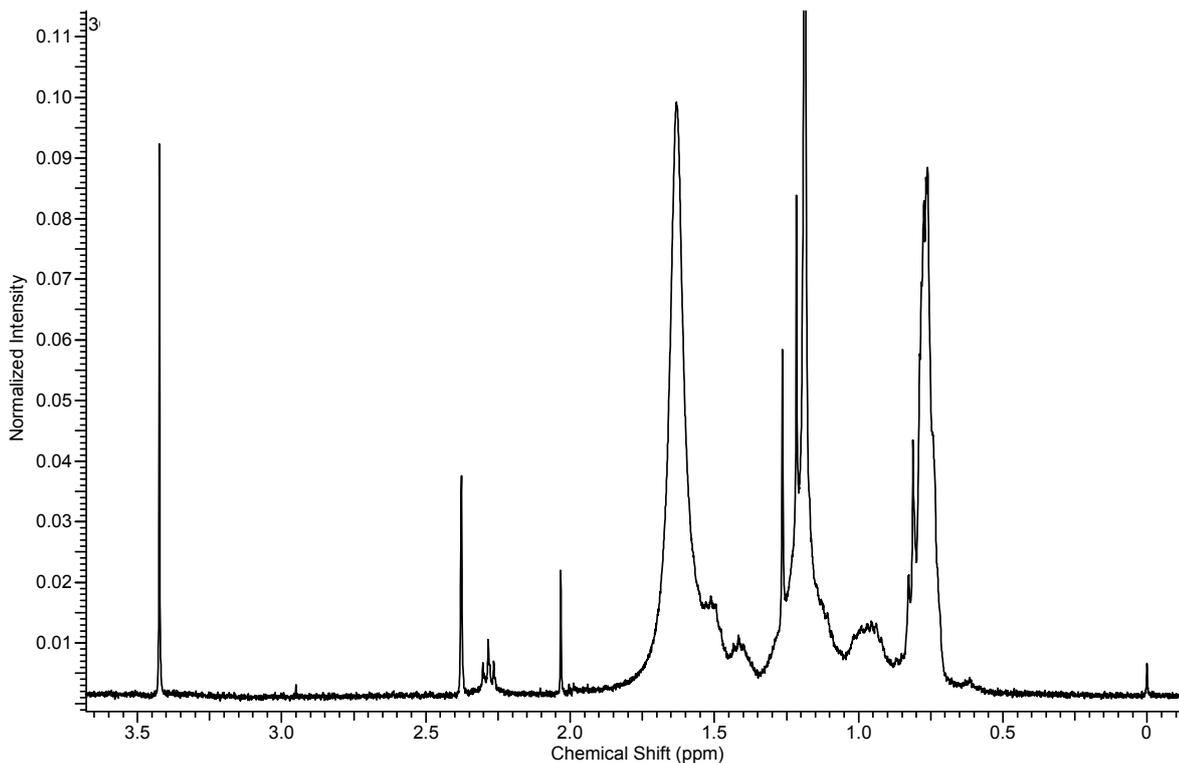


Figura 9S. Ampliação do espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (II) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

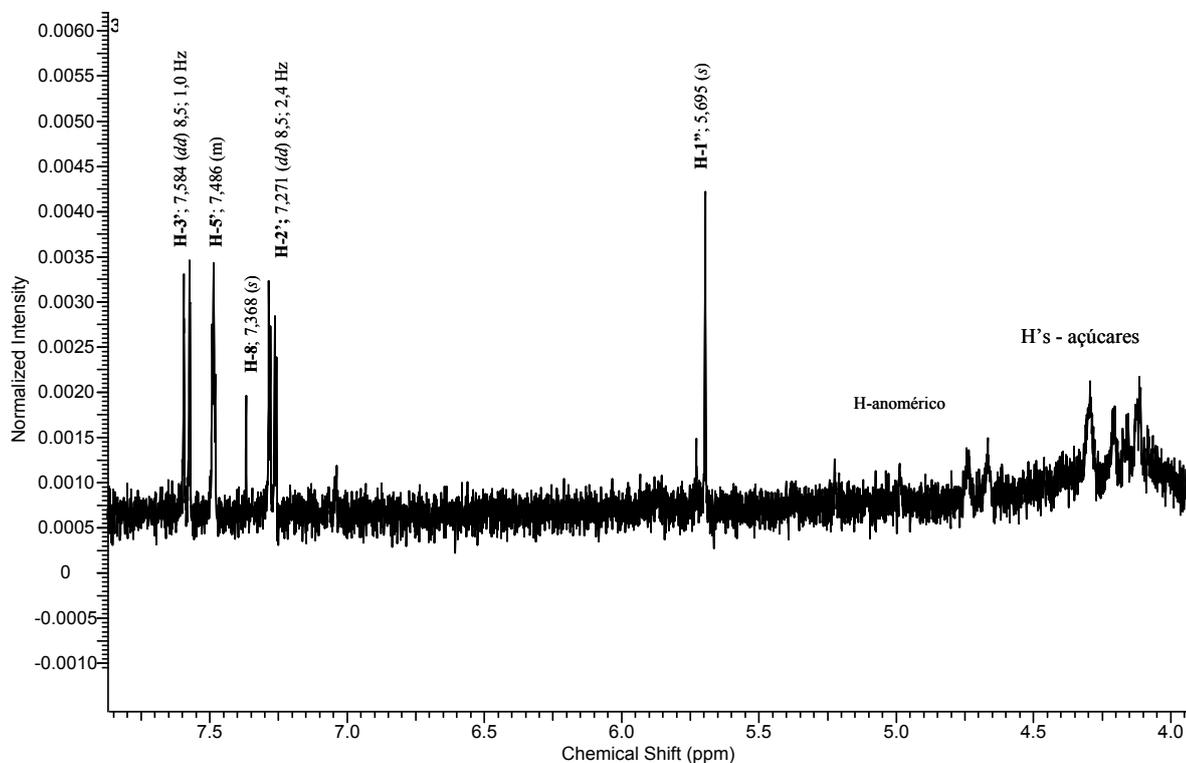


Figura 10S. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

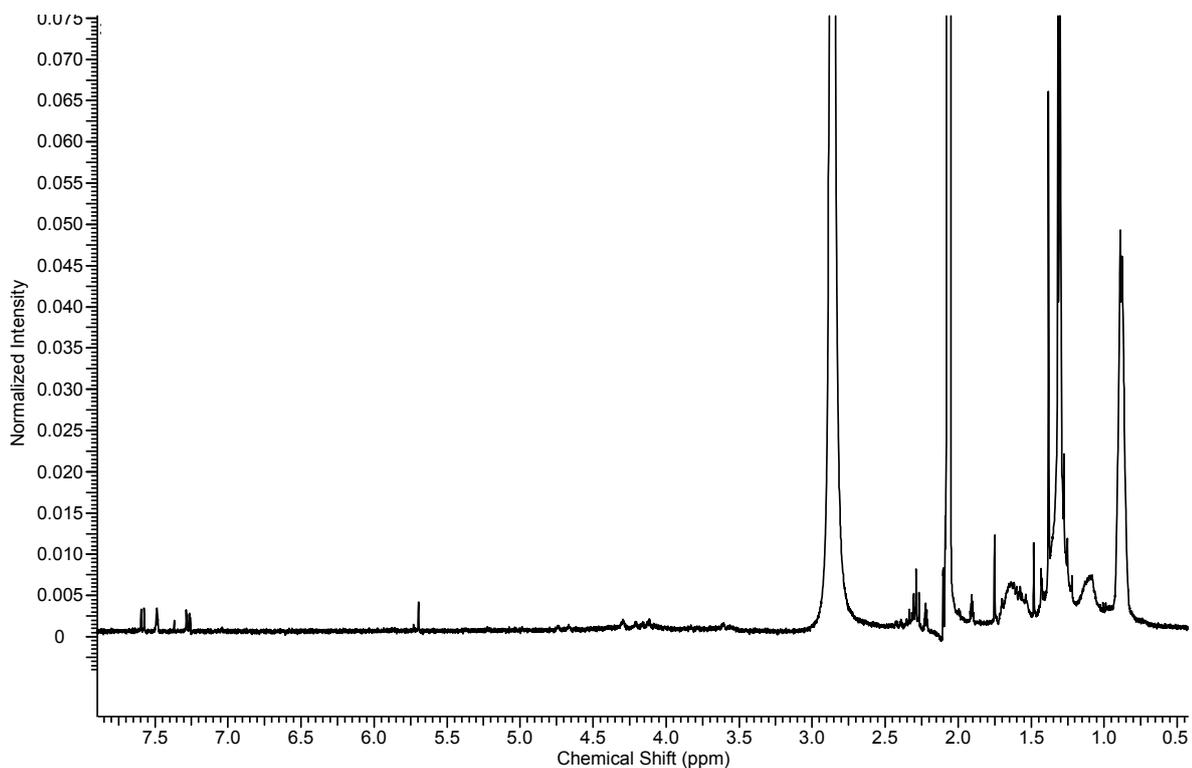


Figura 11S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 4,0 e 8,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

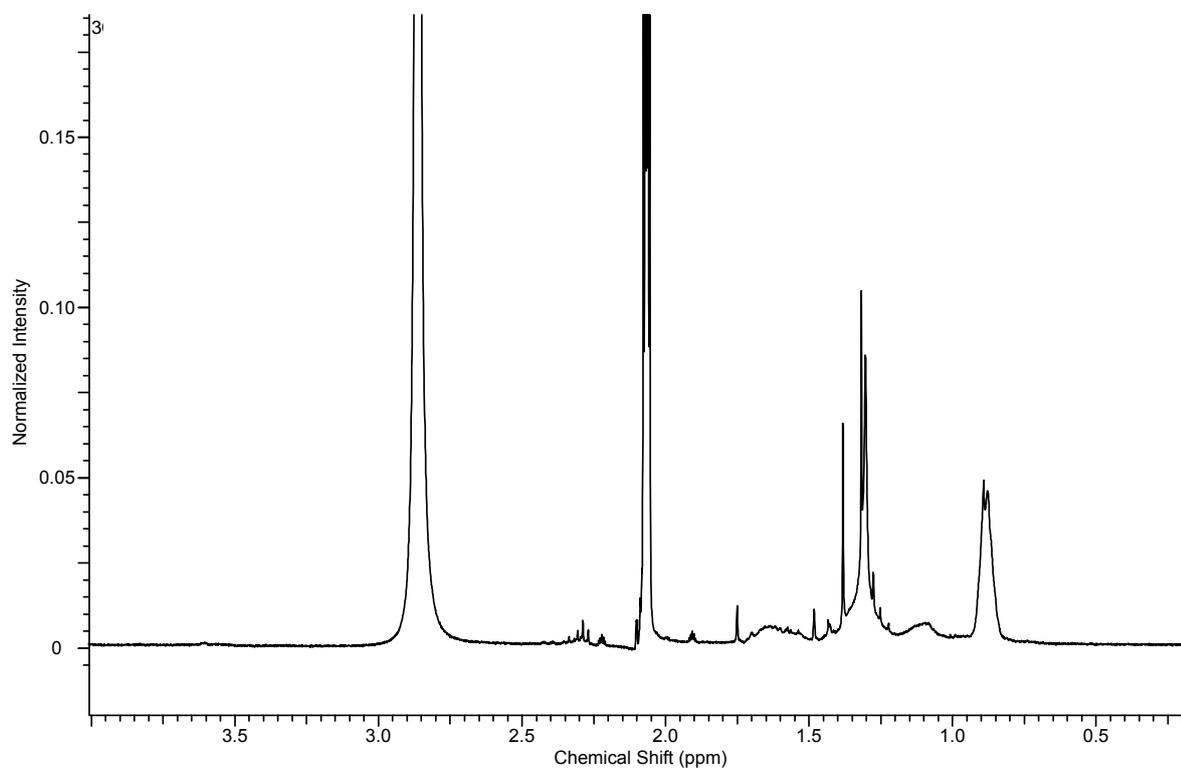


Figura 12S. Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) na região entre 0 e 4,0 ppm do composto isolado a partir da sub-fração F8F (V) oriunda da fração hexânica das folhas de *Sapindus saponaria*.

## CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de folha e caule/cascas do caule de *S. lethalis* e *S. saponaria* foram fitotóxicos e inibiram o processo de germinação e o crescimento das plântulas de espécies cultivadas e daninhas, com efeito dependente da concentração. A fitotoxicidade dos extratos variou de acordo com a espécie receptora, sendo que, na maioria dos casos, o extrato foliar apresentou maior atividade inibitória. Para algumas variáveis, esse efeito foi similar e até mesmo superior ao do herbicida comercial. Um dos modos de ação observado foi no crescimento radicular das plântulas de gergelim e amendoim-bravo, em que os extratos ocasionaram uma diminuição significativa no alongamento das células do metaxilema.

A fração AcOEt proveniente do extrato etanólico das folhas de *S. saponaria* apresentou efeito inibitório superior ao da fração hexânica sobre o desenvolvimento das plântulas de capim arroz e amendoim-bravo. O estudo fitoquímico dessa fração resultou no isolamento do ácido 3-(1,2-dimetil-5-oxabicyclo[2.1.1]hexan-2-il)but-2-enoico, um ácido monoterpreno com características espectroscópicas não conhecidas na literatura. Esse composto também inibiu a germinação e o crescimento das espécies daninhas; porém, a fração AcOEt atuou com mais intensidade na redução do crescimento dessas plântulas.

A fração hexânica oriunda do extrato etanólico de folhas de *S. saponaria* apresentou efeito fitotóxico sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo e ocasionou elevada mortalidade sobre ninfas e adultos de *T. citricidus*. As principais substâncias identificadas nessa fração foram os flavonóis derivados do caempferol e quercetina, e estes podem estar envolvidos na atividade biológica observada. Assim, *S. saponaria* pode ser uma espécie doadora de compostos com potencial inseticida e herbicida, sendo uma boa candidata para o fornecimento de aleloquímicos para uso futuro na agricultura.