

IZABELLA MARTINS DA COSTA RODRIGUES

**HISTOQUÍMICA E PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR
Senna alata (L.) Roxb. COM POTENCIAL ATIVIDADE ALELOPÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696h
2008

Rodrigues, Izabella Martins da Costa, 1982-
Histoquímica e prospecção de compostos produzidos
por *Senna alata* (L.) Roxb. com potencial atividade
alelopática / Izabella Martins da Costa Rodrigues.
– Viçosa, MG, 2008.
xi, 76f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Affonso Ferreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Ecologia química. 3. Fitoquímica.
4. Compostos alelopáticos. 5. Plantas daninhas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 577.82

IZABELLA MARTINS DA COSTA RODRIGUES

**HISTOQUÍMICA E PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR
Senna alata (L.) Roxb. COM POTENCIAL ATIVIDADE ALELOPÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

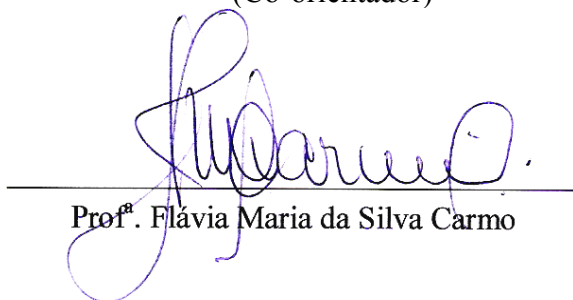
APROVADA: 26 de setembro de 2008.



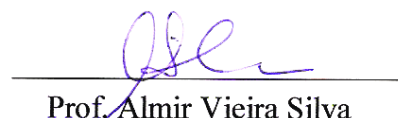
Pesquisador Antônio Pedro da Silva Souza Filho
(Co-orientador)



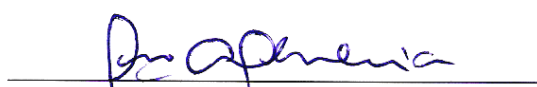
Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Co-orientador)



Prof.^a Flávia Maria da Silva Carmo



Prof. Almir Vieira Silva



Prof. Francisco Affonso Ferreira
(Orientador)

“Natureza tem seus planos, mas não sabe ser ruim...”
Almir Sater

*Aos meus pais Mauro Lúcio Rodrigues e Ana Maria Martins da Costa Rodrigues,
pelo apoio e amor incondicional... “...a raiz da raiz, e o botão do botão e o céu do
céu de uma árvore chamada vida, que cresce mais alta do que a alma pode
esperar...”*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço;

À Deus e à Santa Rita de Cássia, meus zelosos guardadores pela proteção e pelas Graças alcançadas;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia pelas oportunidades;

Ao Departamento de Biologia Vegetal; à Revista Planta Daninha; à Embrapa Amazônia Oriental- Belém-PA; ao Museu Paraense Emílio Goeldi; À Universidade Federal do Pará; ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, UFV.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida;

Ao meu orientador Francisco Affonso Ferreira, não só pela orientação, mas principalmente pelo exemplo e amizade. Por ter me estendido a mão para ajudar-me a subir mais um degrau, por ter acreditado em mim e valorizado as minhas idéias. Obrigada;

Ao meu co-orientador Antônio Pedro da Silva Souza Filho por seu espírito sempre inovador, por ter me orientado em um novo lugar e um novo caminho;

Ao meu conselheiro Antônio Jacinto Demuner;

Aos funcionários da Embrapa Amazônia Oriental;

À minha mãe Ana Maria Martins da Costa Rodrigues e ao meu pai Mauro Lúcio Rodrigues, vocês foram o começo de tudo, meus primeiros professores. Com a licença poética de E. E. Cummings “Eu Carrego seus corações comigo, eu os carrego no meu coração, eu nunca estou sem ele, onde quer que eu vá vocês vão...”;

Aos meus irmãos, Léo e Sofia, por todo amor, carinho, admiração, exemplo e pela FAMÍLIA, nosso tesouro mais sagrado;

À Almir Vieira Silva, por tudo o que compartilhamos e aprendemos juntos, pelo seu amor e cuidado, pela saudade e ausência consentida (eu aqui e você ali);

À João Gabriel, sobrinho e afilhado, por toda a magia presente nos seus olhinhos brilhantes como as estrelas e os seus sonhos;

À Tia Lau, por todo amor e orações;

A toda minha família, em especial, às meninas queridas de Nova Era, Cida, Marcela e Marcinha, pela cumplicidade;

Às minhas eternas irmãs de coração, Fernanda e Ananda, por nossos momentos;

À Jussara e Mariana, minhas irmãs siamesas, por toda a beleza que existe numa amizade entre almas gêmeas, que nunca há de se perder no tempo ou no espaço;

A todos os amigos de João Monlevade, Viçosa, Belo Horizonte e Belém...;

À D. Zizinha, minha mãe de Viçosa;

A todos os mestres, professores e orientadores, pelos ensinamentos, em especial à Profa. Flávia Cristina Pinto Garcia;

A todas as pessoas que me auxiliaram nesta caminhada, e contribuíram para a realização deste trabalho;

À Biologia pela vida.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA	9
ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Senna alata</i> (L.) Roxb. POR DUAS METODOLOGIAS	14
RESUMO	14
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
LITERATURA CITADA	23
EFEITOS ALELOPÁTICOS E AUTOTÓXICOS DE EXTRATOS HIDROMETANÓLICOS DE DIFERENTES ESTRUTURAS DA ESPÉCIE <i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
LITERATURA CITADA	35
PROSPECÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR <i>Senna alata</i> (L.) Roxb. COM ATIVIDADE ALELOPÁTICA	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
LITERATURA CITADA	53
ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DAS FOLHAS DE <i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	57
RESUMO	57
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
LITERATURA CITADA	71
CONCLUSÕES GERAIS	75

RESUMO

RODRIGUES, Izabella Martins da Costa, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2008. **Histoquímica e prospecção de compostos produzidos por *Senna alata* (L.) Roxb. com potencial atividade alelopática.** Orientador: Francisco Affonso Ferreira. Co-orientadores: Antônio Jacinto Demuner e Antônio Pedro da Silva Souza Filho.

Um dos aspectos mais explorados da alelopatia, em ecossistemas manipulados, é o seu papel na agricultura. Atualmente, o potencial alelopático de várias plantas tem sido avaliado como um dos métodos de controle alternativo, reduzindo o intensivo uso de herbicidas sintéticos. Em observação de campo, de indivíduos da espécie *Senna alata* (L.) Roxb., verificou-se um crescimento vegetativo rápido com tendência a formação de estandes puros, sendo esta uma evidência de alelopatia. Objetivou-se, neste estudo, a identificação, por testes fitoquímicos, das principais classes de compostos potenciais aleloquímicos, encontradas nas diferentes estruturas desta espécie; a avaliação da atividade potencial autotóxica e alelopática dos extratos provenientes de tais estruturas, sobre a germinação de sementes e o alongamento inicial de plantas de áreas de pastagens cultivadas da região Amazônica; a prospecção das substâncias químicas na estrutura com maior atividade alelopática inibitória de *S. alata*; estudos anatômicos das folhas e testes histoquímicos para a localização e identificação dos aleloquímicos nas células do mesofilo. O material vegetal foi coletado de plantação em Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil, seco em estufa e submetido à extração exaustiva com solvente hidrometanólico (3:7), por sete dias para obtenção dos extratos brutos. Nos testes fitoquímicos, foram comparadas duas metodologias distintas para a determinação das principais classes de constituintes potenciais aleloquímicos das diferentes estruturas (caules, flores, folhas, raízes, sementes e vagens) de *S. alata*: testes por cromatografia em camada delgada (CCD) e ensaios para a detecção preliminar dos diferentes constituintes químicos, baseado na extração destes com solventes apropriados e na aplicação de testes de coloração. Para o exame prévio de seu potencial alelopático e autotóxico, utilizaram-se extratos hidrometanólicos das diferentes estruturas sobre a germinação de sementes e o alongamento da radícula e hipocótilo de duas espécies daninhas de áreas de pastagens: *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, da forrageira *Pueraria phaseoloides* e da própria *S. alata*. Para a prospecção, isolamento e identificação dos compostos presentes nas folhas de *S. alata* e seus testes sobre as espécies: *M. pudica*, *S. obtusifolia* e *S. alata*, o extrato bruto foi fracionado via cromatografia de adsorção em coluna, sendo as frações mais puras submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e

de carbono 13 para a determinação das estruturas de suas moléculas. Para as análises anatômica e histoquímica das folhas foram utilizadas técnicas usuais em anatomia vegetal. Os resultados da fitoquímica de ambos os métodos demonstraram pouca semelhança, sendo a CCD o mais simples, barato e rápido. Nestas primeiras análises, foi comprovada a alta diversidade de compostos químicos presentes em *S. alata*. Nos testes preliminares alelopáticos e autotóxicos, os resultados indicaram que o sítio de maior biossíntese de aleloquímicos em *S. alata* está situado em suas folhas, e os efeitos autotóxicos dos extratos das frações desta espécie são somente percebidos no crescimento inicial da plântula, afetando em maior parte o seu sistema radicular. A espécie mais sensível, no geral, foi a congênica *S. obtusifolia*. No fracionamento das substâncias existentes nas folhas de *S. alata* foi encontrado em uma fração mais polar, compostos da classe dos flavonóides glicosilados, cujo núcleo aromático foi identificado por RMN como kaempferol. Nos bioensaios alelopáticos observou-se, novamente que a espécie mais sensível, foi *S. obtusifolia*, confirmando os resultados preliminares. Também, mais uma vez *S. alata* mostrou ser a mais tolerante aos efeitos autotóxicos da fração polar. E finalmente nos ensaios anatômicos e histoquímicos as folhas apresentaram duas formas de tricomas: tectores e glandulares. As principais características da espécie foram: lâmina foliar anfiestomática, com estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral e presença de compostos fenólicos. As folhas são ricas em cristais de oxalato de cálcio ao longo de suas nervuras e compostos fenólicos, tais como flavonóides e antraquinonas, em diferentes células.

ABSTRACT

RODRIGUES, Izabella Martins da Costa, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, september 2008. **Histochemistry and prospection of compounds produced by *Senna alata* (L.) Roxb. with potential allelopathic activity.** Adviser: Francisco Affonso Ferreira. Co-advisers: Antônio Jacinto Demuner and Antônio Pedro da Silva Souza Filho.

One of the most important aspects of allelopathy, in manipulated ecosystems, is its role in agriculture. Currently, the allelopathic potential of diverse species has been evaluated as one of the alternative control methods, reducing the intensive use of synthetic herbicides. In field observation of individuals of the specie *Senna alata* (L.) Roxb., was verified a rapid vegetative growth trending to form pure stands, and this is an evidence of allelopathy phenomenon. The study objective was the identification, by phytochemical tests, of the main compound classes of potential allelochemicals, found in this specie different structures; the evaluation of potential allelopathic and autotoxic activity of these structures extracts on the seeds germination and initial elongation of plants found in Amazon cultivated pastures; prospection of chemicals in the most allelopathic inhibitory active structure of *S. alata*; leaf anatomical studies and histochemical tests for the location and identification of the allelochemicals in the mesophyll cells. The plant material was collected from cultivate in Experimental Field of Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pa, Brazil, dried and had been then submitted to exhaustive extraction with hydromethanolic solvent (3:7), by seven days, to obtain the crude extracts. In phytochemical tests were compared two different methodologies to determine the main classes of constituents potential allelochemicals of different structures (stems, flowers, leaves, roots, seeds and pods) from *S. alata*: tests by thin-layer chromatography (TLC), and tests to preliminary detection of distinct chemical constituents, based on their extraction with appropriate solvents and application of color testing. For the previous exam of its allelopathic and autotoxic potencial, hydromethanolics extracts of different fractions of *S. alata* were applied on the seed germination and radicle and hypocotyl elongation of two pastures weeds: *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*, and one forage legume *Pueraria phaseoloides*, and *Senna alata* itself. For prospection, isolation and identification of present compounds in *S. alata* leaves and its allelopathic tests under: *M. pudica*, *S. obtusifolia* and *S. alata*, the crude extracts was fractioned through an adsorption chromatography column, and the most pures fractions were submitted to the Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of hydrogen and carbon 13 to determine their structures. To the leaves anatomical and histochemical analyses usual techniques in plant anatomy were used. The

phytochemical results of both methods demonstrated few similarities, and the TLC was the simplest, cheaper and faster. In this prime analysis, was comproved the high diversity of chemical compounds present in *S. alata*. In preliminary allelopathic and autotoxic tests, the results indicated that the major site of allelochemicals biosynthesis in *S. alata*, is found in their leaves, and the autotoxic effects of *S. alata* extracts are observed only in the early growth of seedlings, affecting mostly their root system. The most sensible specie, in general, was congener *S. obtusifolia*. Chemical investigation of *S. alata* leaves resulted on isolation, in the most polar fraction, of compounds belonged to the flavonoids glycosides class, which aromatic core were identified by NMR spectroscopic analysis as kaempferol. In allelopathic bioassays, the most sensible specie, was again *S. obtusifolia*, comproving the preliminarly results. Also, once and again *S. alata* showed to be more tolerant to the autotoxics effects of the fraction. And finally in the anatomical and histochemical trials, the leaves presented two forms of trichomes: tectors and glandulars. The principal characteristics of the specie were: amphiestomatic leaf, with paracytic stomata, dorsiventral mesophyll, and phenolic compounds presence. Leaves are rich in calcium oxalate crystals along their veins, and other phenolic compounds, such as flavonoids and anthraquinones, in different cells.

INTRODUÇÃO GERAL

Alelopatia

O termo alelopatia deriva do grego *allelon*, mútuo, e *pathos*, prejuízo, e foi cunhado pela primeira vez em 1937 por Molisch, para designar os efeitos de substâncias venenosas, através das quais as plantas podem impedir a colonização de outras espécies vegetais ao seu redor (Ferreira & Áquila; 2000; Larcher, 2000). É definido por Rice (1984), como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo microorganismos) exerce sobre outra, pela produção de compostos químicos liberados no ambiente, denominados de aleloquímicos.

Desde 1960, a alelopatia é amplamente reconhecida como importante mecanismo ecológico que exerce um papel apreciável na dominância, sucessão, formação de comunidades de plantas e clímax de vegetações naturais e produtividade agrícola em agroecossistemas (Chou, 1999).

Para Reigosa et al. (1999), mesmo que alguns autores questionem a existência de alelopatia, indubitavelmente, plantas produzem metabólitos secundários que, em certas circunstâncias, podem agir como fitotoxinas, inibindo ou promovendo alguns processos bioquímicos ou fisiológicos em outras plantas ou organismos. Alguns destes compostos são lançados no ambiente por lixiviação, decomposição da serrapilheira, exsudados de raiz ou volatilização, e podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de outras espécies. Ainda algumas plantas aquáticas, como *Eichornia crassipes*, o aguapé e, *Pistia stratiotes*, o repolho d'água, apresentam a capacidade de liberar aleloquímicos no ambiente em que vivem e afetar o desenvolvimento de outras plantas ou algas, no mesmo ambiente.

A formação de estandes puros e sua adaptabilidade ecológica podem estar relacionadas ainda, ao fenômeno da autotoxicidade. Também conhecido como auto-alelopatia, a autotoxicidade ocorre quando a planta libera uma substância química no ambiente que inibe a germinação e o crescimento de outras plantas da mesma espécie. Embora grande número de plantas produzam aleloquímicos tanto quanto autoquímicos, algumas delas desenvolveram mecanismos para evitar essa autotoxicidade. Métodos para superar os riscos de autotoxicidade podem variar até mesmo dentro da planta, e pode ser manifestado por todo o organismo, em órgãos e tecidos específicos, ou em diferentes níveis subcelulares e moleculares (Singh et al., 1999). Inibição autotóxica exibida no centro de comunidades de espécies perenes que crescem bastante adensadas pode promover uma expansão vegetativa e produção de sementes nas margens desta comunidade, aumentando assim a colonização de novos habitats (Reigosa et al., 1999).

Recentemente, foi demonstrado que algumas variedades de cevada, cultivadas na Tunísia, apresentaram efeito alelopático contra outras variedades da própria cevada, podendo reduzir a produtividade de grãos quando se realiza seu cultivo incessante (Oueslati et al., 2005).

Compostos químicos com atividade alelopática estão presentes (usualmente na forma conjugada) em teoricamente todas as plantas e vários tecidos, incluindo folhas, flores, frutos, botões, sementes, caules e raízes (Putnan, 1988; Burgos et al., 1999). Muitos destes compostos não foram, até o momento, identificados. Pesquisas têm sido conduzidas para isolar e identificar a estrutura química dos aleloquímicos, existindo também diversas tentativas em agrupá-las, como Rice (1984), que propõe o agrupamento dos compostos químicos alelopáticos em 14 categorias, conforme sua similaridade química, e indica suas prováveis vias de síntese.

Talvez o melhor termo para descrever a natureza química de aleloquímicos seja diversidade, eles vão desde simples hidrocarbonetos a complexos compostos policíclicos com alto peso molecular. Muitos dos compostos aleloquímicos identificados são produtos das rotas do ácido chiquímico e do acetato (Rice, 1984). Os aleloquímicos são, em geral, ácidos graxos de cadeia curta, óleos essenciais, diterpenos, alcalóides, esteróides, compostos fenólicos: flavonóides, naftoquinonas, antraquinonas e derivados de cumarina (Larcher, 2000; Cipollini et al., 2008; Macías et al., 2008; Pergo et al., 2008). Fenóis compreendem os aleloquímicos mais abundantemente estudados desde sua primeira observação científica, em 1908, como influente na infertilidade de solos; terpenóides são compostos aleloquímicos também freqüentemente estudados (Reigosa et al., 1999; Macías et al., 2008). É de extrema importância dissipar a falsa idéia de que fenômenos alelopáticos são causados por uma única substância, geralmente a interferência ocorre pela ação combinada de um número de aleloquímicos, e este impacto é influenciado também por outros fatores de estresse ambiental.

É muito difícil estudar alelopatia independentemente de outras relações ecológicas, entretanto, um certo progresso tem sido alcançado nesta área, atualmente. (Reigosa et al., 1999). O fenômeno alelopatia é sempre relacionado a outros parâmetros ambientais e é difícil separá-lo do complexo ambiental (Chou, 1999). Pela complexidade dos fenômenos alelopáticos, com múltiplas variáveis possíveis, há autores que afirmam que a separação entre alelopatia e competição, não seria natural. Ferreira & Aquila (2000) consideram que o efeito alelopático dependeria da liberação pela planta de um composto químico no ambiente, enquanto que competição envolveria remoção ou redução de um fator ambiental, tal como água, minerais, luz, etc.

Um dos aspectos mais explorados da alelopatia, em ecossistemas manipulados, é o seu papel na agricultura (Rizvi & Rizvi, 1992). A vegetação de uma determinada área pode ter um modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas que estas liberaram no meio (Ferreira & Aquila, 2000). Têm-se demonstrado que diversas espécies, além das cultivadas presentes em agroecossistemas, podem exercer influência alelopática sobre culturas, conseqüentemente afetando sua germinação e crescimento. Em algumas espécies cultivadas observou-se que seus resíduos podem controlar ou até mesmo suprimir a emergência e crescimento vegetativo de algumas espécies de plantas daninhas (Chom & Kim, 2004).

Muitos grupos têm se esforçado na tarefa de isolamento e identificação de aleloquímicos como potenciais herbicidas naturais e na produção de cultivares altamente alelopáticas (Rizvi & Rizvi, 1992). A seleção de genótipos superiores com potencial alelopático tem sido realizada em vários campos de culturas, e há um acúmulo de evidências de cultivares que diferem significativamente na habilidade em inibir o crescimento de certas espécies daninhas (Song et al., 2008). Entretanto, mais pesquisas devem ser realizadas com a finalidade de se obter um melhor entendimento sobre o controle genético da atividade alelopática. Muitos genes podem estar envolvidos na regulação da produção e exsudação de aleloquímicos, como demonstra o estudo realizado por Song et al. (2008) com a variedade de arroz alelopática PI312777, que sugere que sua forte habilidade em suprimir espécies daninhas, ao redor, pode ser atribuída à intensa ativação de genes que funcionam na síntese *de novo* de aleloquímicos.

Geralmente os aleloquímicos agem produzindo mudanças nas funções fisiológicas das plantas como respiração, fotossíntese e absorção de íons. Essas mudanças resultam em alterações visíveis na germinação e no desenvolvimento das plantas. Respostas de processos fisiológicos podem ser esperadas de acordo com a variação na concentração de um aleloquímico (Reigosa et al., 1999). É difícil resumir o modo de ação de aleloquímicos, já que são substâncias muito diferentes e dependentes de muitas circunstâncias, como concentração e temperatura. Além disso, o tempo de residência, a persistência e a transformação podem aumentar, diminuir ou fazer cessar o seu efeito alelopático, pela ação de microorganismos do solo (Ferreira & Áquila, 2000).

Os estudos mais freqüentes sobre alelopatia estão relacionados aos efeitos de extratos de plantas sobre a germinação e crescimento de outras. Em geral, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula (Reigosa & Malvido, 2007). Apesar da maioria dos estudos em alelopatia se concentrarem no exemplo acima,

muitos outros trabalhos consideram os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas. Atualmente, segundo Hachinohe & Matsumoto (2007) L-3,4-Dihidroxifenilalanina (L-dopa) é um dos poucos aleloquímicos que são estudados quanto ao seu mecanismo de ação. O excesso de L-dopa exógeno sobre algumas espécies vegetais suprimem o alongamento da radícula. O dano oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio e espécies de radicais livres é considerado o principal fator de fitotoxicidade deste composto.

Alguns outros trabalhos estimam o efeito alelopático sobre vários processos celulares que em conjunto afetam a germinação e o crescimento das plantas. Como exemplo, Pergo et al. (2008) observaram efeitos alelopáticos de cumarina sobre a germinação e crescimento de *Bidens pilosa* L.. Posteriores análises de alguns parâmetros do metabolismo energético revelaram alta atividade respiratória e alta atividade da álcool desidrogenase e lipoxigenase em tecidos de raízes de *B. pilosa* tratados com cumarina, sugerindo que este composto parece agir como um agente citostático, retardando a germinação e que pode induzir estresse oxidativo nas raízes das plântulas.

Mesmo que exista uma considerável riqueza de literatura sobre alelopatia e metodologias de extração e ensaios biológicos, esta ainda é uma área pouco esclarecida na ecologia química, sendo assim, torna-se necessário muito mais pesquisas para diferenciar alelopatia de relações competitivas e não competitivas.

Herbicidas e Aleloquímicos: Polêmica versus Alternativa

A ciência da alelopatia progrediu a tal ponto que seus fundamentos descritivos e experimentais propiciaram uma base que pode ser utilizada como ferramenta para a produção agrícola. Uma vez que os aleloquímicos são comuns nos vegetais, comprovadamente tóxicos para as plantas, potencialmente efetivos, seletivos e muitas vezes, ambientalmente seguros, admite-se a possibilidade de, conhecida a estrutura química dos componentes ativos envolvidos, se obter herbicidas com vantagens ecológicas de produtos naturais (Rizvi & Rizvi, 1992). Ainda, resíduos de cultura e plantas daninhas, práticas agrícolas e rotação de culturas podem ser manejados para minimizar perdas na produtividade provocadas por alelopatia e para o controle de plantas daninhas.

Produtos naturais pode ser a chave para a química de novos herbicidas. Por modificação de suas moléculas, o produto final pode ser mais ativo, seletivo ou persistente. O precursor para este produto final pode ser obtido de fontes naturais (a

própria planta), se a economia deste procedimento for superior à de sua síntese química (Putnan, 1988).

Novos mecanismos de ação para herbicidas são altamente desejáveis para combater a evolução de resistência em plantas daninhas, uma vez que herbicidas comerciais têm número limitado de sítios alvo. Uma comparação entre os conhecidos sítios alvo de herbicidas sintéticos e de fitotoxinas naturais revela que existe pequena redundância. Comparativamente pouco esforço tem sido dispensado na determinação dos sítios de ação de fitotoxinas de origem natural, sugerindo que um estudo intensivo destas moléculas pode revelar novos mecanismos de ação (Duke et al., 2000).

***Senna alata* (L.) Roxb.**

Na Região Amazônica, as áreas de pastagens cultivadas são infestadas por comunidade de plantas daninhas, sendo este o principal problema de ordem bioeconômica a limitar o desempenho produtivo e a rentabilidade da atividade agrícola. Conhecida popularmente como mata-pasto, *Senna alata* (L.) Roxb. é um bom exemplo de espécie prejudicial às pastagens da região. É uma espécie perene, arbustiva que apresenta crescimento vegetativo extremamente rápido, com tendência à formação de estandes puros. Esta pode ser uma evidência de dois fenômenos: alelospolia e alelopatia. A espécie é medianamente freqüente em áreas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, em quase todo o Brasil, principalmente em lugares úmidos (Lorenzi, 2000). Provavelmente nativa do Norte da América do Sul, foi naturalizada e cultivada desde os Estados Unidos da América até a Argentina (Irwin & Barneby, 1982). *S. alata* pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Em inventário florístico realizado em vegetação secundária na região Bragantina, a leste de Belém do Pará, *S. alata* foi encontrada entre os indivíduos de Leguminosae, a família representada pelo maior número de espécies (Baar et al., 2004).

Leguminosae é a terceira maior família das Angiospermas, contendo aproximadamente 730 gêneros e 19.400 espécies (Lewis et al., 2005). Das três subfamílias, Caesalpinioideae é tida como grupo ancestral dentre as leguminosas (Polhill & Raven, 1981). O gênero *Senna* Mill. pertence à tribo Cassieae Bronn, subtribo Cassinae Irwin & Barneby (Irwin & Barneby, 1981), e destaca-se entre os maiores gêneros da subfamília Caesalpinioideae (Cronquist, 1981). *Senna* é um gênero pantropical e circuntropical, com 260 espécies, das quais 200 ocorrem no continente americano (Irwin & Barneby, 1981). As espécies de *Chamaecrista* e *Senna* eram incluídas em *Cassia sensu lato* até o tratamento taxonômico de Irwin & Barneby (1981),

quando estes gêneros foram separados. Alguns autores não consideram tal divisão, portanto, neste trabalho, todas as vezes que o gênero *Cassia* for citado, estaremos, na verdade, nos referindo à *Senna*. Trabalhos recentes baseados em morfologia floral têm suportado esta divisão (Boonkerd et al, 2005). O gênero *Cassia s. l.* possui um longo histórico e importância econômica, especialmente como plantas medicinais (Boonkerd, 2005).

Segundo Gupta & Singh (1991), espécies do gênero *Senna* são ricas em flavonóides, antraquinonas e polissacarídeos. Também já foram relatados para este gênero esteróides, alcalóides piperidínicos, isoquinolinas, cromonas, lactonas, estilbenos, triterpenos, entre outros (Alemayehu & Abegaz, 1996; Alemayehu et al., 1998; Valencia et al., 2000; Pivatto et al., 2006).

Várias espécies de *Senna* são usadas na medicina popular – *S. alexandrina*, *S. angustifolia*, *S. corymbosa*, *S. didymobotrya*, *S. italica*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis*, *S. reticulata*, *S. spectabilis*, *S. sophera*, *S. stipulaceae* – a maioria como laxante, com uso principalmente de suas folhas. O gênero *Senna* é pródigo como fonte de compostos de natureza antraquinônica com diversas propriedades biológicas e farmacológicas (Alemayehu et al., 1996; 1998; Guo et al. 1998; Hatano et al., 1999; Valencia et al., 2000; Arrieta-Baez et al., 2002; Santos & Silva, 2006; Pivatto 2006; Plantamed, 2007).

S. alata possui, também, propriedades terapêuticas, entretanto deve ser ministrada com cuidado, pois é suspeita de ser tóxica aos rins e é, ainda, considerada abortiva (Lorenzi, 2000; Plantamed, 2007). Porém, estudos recentes mostraram fortes evidências do efeito não tóxico do extrato hidroetanólico de *S. alata*, explicando dessa forma, o uso extensivo da planta na medicina tradicional (Pieme et al., 2006). Em Cuba, Camarões, no Brasil, na Índia e em outros países, suas folhas, cascas, flores e raízes, podem ser utilizadas na medicina popular por suas propriedades antiherpética, febrífuga, antianêmica, antiblenorrágica, antitumorais, antinefrítica, antídota, antimicótica, diurética, parasiticida, laxante, e contra doenças de pele (Arrieta-Baez et al., 2002; Barrese Pérez & Hernández Jiménez, 2002; Awal et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Pieme et al., 2006; Plantamed, 2007). Na Índia, quase todas as partes da planta são descritas por seus valores terapêuticos nos sistemas de medicina ayurvedica, unani e alopática (Damodaran & Venkataraman, 1994). Na África, é plantada ao redor das casas para espantar formigas (Barrese Pérez et al., 2005). Os constituintes das folhas já foram investigados por suas propriedades antiinflamatórias, antifúngicas e analgésicas, têm sido demonstrada, também, a atividade antibacteriana do extrato de *S. alata*

(Palanichamy & Nagarajan, 1990a,b; Ali-Emanuel et al., 2003; Awal et al., 2004; Ordoñez et al., 2004; Pieme et al., 2006).

Os efeitos alelopáticos de extratos de várias plantas medicinais têm sido investigados, Agbagwa et al. (2003) demonstrou que o extrato bruto de *S. alata* induziu decréscimo consistente no percentual absoluto e na taxa de germinação, além de inibir o crescimento da radícula em *Celosia argentea*.

Entre os componentes até então identificados, em *S. alata*, estão presentes taninos, triterpenos, esteróides, alcalóides, carboidratos redutores, flavonóides, saponinas, cumarinas, antocianidinas, emodina, antraquinona, chrysarabina, ribarina, ácido málico, tartárico, crisofânico e óleo essencial (Barrese Pérez & Hernández Jiménez, 2002; Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Plantamed, 2007). Suas flores são ricas em flavonóides e vitamina C (Plantamed, 2007).

Estudos encontraram na casca de *Cassia alata* 1,5,7-trihidroxi-3-metil-antraquinona (emodina), dalbergina, 2,6-dimetoxibenzoquinona, santal, luteolina, β -sitosterol and β -sitosteril-D-glicosídeo (Hemlata & Kalidhar, 1993; Kelly et al., 1994). Dois novos flavonóides glicosilados crisoeriol-7-O-(2''-O- β -D-manopiranosil)- β -D-alopiranosídeo e ramnetina-3-O-(2''-O- β -D-mannopiranosil)- β -D-alopiranosídeo, foram isolados de sementes de *C. alata* por Gupta e Singh, (1991), a estrutura foi estabelecida com base em evidências químicas e métodos espectroscópicos, especialmente RMN.

Antraquinonas acumulam-se nas partes aéreas assim como nas raízes. Em um esforço para caracterizar genes de poliketídio sintase de plantas medicinais nativas da Tailândia, e na tentativa de encontrar uma dessas enzimas que catalizassem a formação de antraquinonas, Samappito et al. (2002), isolaram e expressaram funcionalmente isoformas de chalcona sintase de tecidos da raiz de *S. alata*.

Alguns trabalhos reportaram a presença de kaempferol-3-O-gentiobiosídeo em folhas de *C. alata* (Moriyama et al., 2001) Estudo posterior foi realizado na Indonésia, para quantificar este metabólito nas diferentes partes da planta e em diferentes estágios de crescimento, foi demonstrado que as folhas maduras são as que apresentam o maior conteúdo deste produto, e ainda, que durante o período de outubro a dezembro houve um decréscimo no conteúdo deste flavonóide em folhas juvenis (Moriyama et al., 2003).

Fitoquímica

A química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. A importância científica das

pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz pelos resultados obtidos com a consecução de seus objetivos imediatos como pela aplicação destes resultados a outras áreas científicas correlatas.

Matos (1997), propõe o estudo fitoquímico de plantas em etapas principais:

- a) a escolha da planta a ser estudada;
- b) a identificação botânica da planta escolhida;
- c) a prospecção preliminar de sua composição química;
- d) o isolamento e a purificação dos constituintes principais;
- e) o esclarecimento da estrutura molecular dos compostos puros e isolados;
- f) o levantamento das referências bibliográficas sobre a espécie identificada e seus congêneres.

Muitas vezes se busca o isolamento e a caracterização de compostos de interesse acadêmico, sejam novos compostos não registrados na literatura especializada, ou intermediários de processos de biossíntese de importância quimiotaxonômica. Outras vezes, intenta-se encontrar e isolar substâncias de interesse econômico, principalmente novos agentes medicamentosos, ou novas fontes de compostos raros já utilizados. Várias técnicas, algumas muito simples, outras mais sofisticadas, estão disponíveis para a prospecção destas substâncias. Denominamos “screening” ao conjunto destas técnicas de prospecção, elaboradas de tal modo que possam fornecer resultados rápidos, ao mesmo tempo em que permitam ao pesquisador certo grau de familiarização com o material trabalhado. Seu planejamento deve ser feito de acordo com objetivos específicos, seja químico, farmacológico ou ainda dirigido para um determinado tipo de ação (quando se procuram inseticidas naturais, por exemplo) ou um determinado tipo de constituinte como alcalóides, ou ainda classes especiais de substâncias de interesse tecnológico como os óleos essenciais e os óleos fixos (Matos, 1997).

Já a determinação da estrutura molecular dos constituintes isolados se constitui em um campo especializado da química orgânica e é feita principalmente pela interpretação de vários espectros obtidos em aparelhagem especial, principalmente espectrômetros de absorção das radiações ultravioleta, visível e infravermelha, espectrômetro de ressonância magnética protônica e de carbono 13 e espectrômetro de massas.

LITERATURA CITADA

- AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F.A.; MENSAH, S.I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Applied Sci. Environ. Manag.**, v.7, n.1, p.9-13, 2003.
- ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B. M. Bianthraquinones from the seeds of *Senna multiglandulosa*. **Phytochemistry**, v.41, n. 3, p.919-921, 1996.
- ALEMAYEHU, G.; HAILU, A.; ABEGAZ, B. M. Bianthraquinones from *Senna didymobotrya*. **Phytochemistry**, v.42, n. 5, p.1423-1425, 1996
- ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B.; KRAUS W.A. 1-4, anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. **Phytochemistry**, v.48, n.4, p.699-702, 1998.
- ALI-EMANUEL, N.; MOUDACHIROU, M.; AKAKPO, J. A.; QUETIN-LECLERCQ. Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 86, p.167-171, 2003.
- ARRIETA-BAEZ, D.; ROMAN, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M. Peroxidase-mediated transformation of hydroxy-9,10-anthraquinones **Phytochemistry**, v. 60, p.567-572, 2002.
- AWAL, M. A.; NAHAR, A.; HOSSAIN, M. S.; BARI, M. A.; HAHMAN, M.; HAQUE, M. E. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. **J. Med. Sci.**, v.4, n.3, p.188-193, 2004.
- BAAR, R.; CORDEIRO, M. dos R.; DENICH, M.; FOLSTER, H. Floristic inventory of secondary vegetation in agricultural systems of East-Amazonia. **Biodiv. Conserv.** v. 13, p. 501-528, 2004.
- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E. Tamizaje fitoquímico de la droga y extracto fluido de la gacamaya francesa. **R. Cub. Plant. Med.**, v.7, n.3, p.1-4, 2002.
- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E.; PULPEIRO, O. G. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 10, n. 2, p .1-5, 2005.
- BOONKERD, T.; PECHSRI, S.; BAUM, B. R. A phenetic study of *Cassia* sensu lato (Leguminosae-Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae) in Thailand. **Plant Syst. Evol.** v.252, p.153-165, 2005.
- BURGOS, N.; TALBERT, R.E.; MATTICE, J.D. Cultivar and differences in the production of allelochemicals by *Secale cereale*. **Weed Science**, v.47, p. 481-485, 1999.

- CHOM, S.U.; KIM, Y.M. Herbicidal potencial and quantification of suspected allelochemichals from four grass crop extrats. **J. Agron. Crop Sci.**, v.190, p.145-150, 2004.
- CHOU, C. H. Methodologies for allelopathic research: from fields to laboratory. In: MACÍAZ, F. A.; GALINDO, C.G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. (Eds.) **Recent Advances in Allelopathy. Vol 1.** A Science for the future. Cádiz: Servicio de Publicaciones-Universidad de Cádiz, 1999. p.3-24.
- CIPOLLINI, D.; STEVENSON, R.; ENRIGHT, S.; EYLES, A.; BONELLO, P. Phenolic Metabolites in Leaves of the Invasive Shrub, *Lonicera maackii*, and Their Potential Phytotoxic and Anti-Herbivore Effects. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 144–152, 2008.
- CRONQUIST A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** New York: Coloumbia University Press. 1981. 1262p.
- DAMODARAN, S.; VENKATARAMAN, S. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata*, Linn. Leaf extract against *Pityriasis versicolor*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, p.19-23,1994.
- DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v.19, p.583-589, 2000.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **R. Bras. Fis. Veg.**, v.12 (Edição especial), p.175-204, 2000.
- GUO, H.; CHANG, Z.; YANG, R.; GUO, D.; ZHENG, J. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia* **Phytochemistry**, v.49, n. 6, p.1623-1625, 1998.
- GUPTA, D.; SINGH, J. Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2761- 2763, 1991.
- HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of Selective Phytotoxicity of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-Dopa).in Barnyardglass and Lettuce **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.1919–1926, 2007.
- HATANO, T.; MIZUTA, S.; ITO, H.; YOSHIDA, T. C-Glycosidic Flavonoids from *Cassia occidentalis*. **Phytochemistry**, v.52, p.1379-1383, 1999.
- HEMLATA; KALIDHAR, S. B. Alantinone, an anthraquinone from *Cassia alata*. **Phytochemistry**. v.32, n. 6, p.1616-1617, 1993.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. Tribe Cassieae Bronn. In: R.M. Polhill & P. H. Raven (eds.). **Advances in legume systematics.** Part 1, Kew: The Royal Botanic Gardens, 1981. p. 97-106.

- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. The American Cassinae, a synoptical revision of Leguminosae, Tribe Cassieae, subtribe Cassinae in the New World. **Mem. New York Botanic Gard.**, v. 35, n.1-2, p.1-918, 1982.
- KELLY, T.R.; MA, Z.; XU, W. Revision of the structure of alantinone to emodin. **Phytochemistry**. v.36, n. 1, p.253-254, 1994.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 592p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 3 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 608p.
- MACÍAS, F. A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G. Helikauranoside A, a New Bioactive Diterpene. **J. Chem. Ecol.**, v.34, p.65–69, 2008.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.
- MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M. A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation **J. Pharm. Soc. Japan** v. 121, n.11, p. 817-820, 2001.
- MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MURATA, Y. HPLC quantification of kaempferol-3-O-gentiobioside in *Cassia alata*. **Fitoterapia** v. 74, p. 425–430, 2003.
- OUESLATI, O.; BEM-HAMMOUDA, M.; GHORBAL, M.H.; GUEZZAH, M.; KREMER, R.J. Barley autotoxicity as influenced by varietal and seasonal variation. **J. Agro. Crop Sci.**, v.191, p.249- 254, 2005.
- ORDOÑEZ, M. G.; GOVÍN, E. S.; BLANCO, M. de los A. G. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v.9, n.1, p.0-0, 2004.
- PALANICHAMY. S.; NAGARAJAN. S. Analgesic effect of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-*O*-sophoroside. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p.73-78, 1990a.
- PALANICHAMY, S.; NAGARAJAN. S. Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p.337-340, 1990b.
- PERGO, E. M.; ABRAHIM, D.; SILVA, P. C. S.; KERN, K. A.; SILVA, L. J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E. L. *Bidens pilosa* L. Exhibits High Sensitivity to Coumarin in Comparison with Three Other Weed Species. **J. Chem. Ecol.**, v.34, p. 499–507, 2008.
- PIEME, C. A.; PENLAP, V.N.; NKEGOUM, B.; TAZIEBOU, C.L.; TEKWU, E.M.; ETOA, F. X.; NGONGANG, J. Evaluation af acute and subacute toxicities of

- aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Caesalpinaceae). **Afric. J. Biotechnol.**, v.5, n.3, p.283-289, 2006.
- PIVATTO, M.; SENNA, D.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; VIEGAS JR., C.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. da S. Aplicação da espectrometria de massas *tandem* (IES-EM/EM) na identificação de séries homólogas e novos alcalóides piperidínicos co-metabólitos nas flores e frutos de *Senna spectabilis* (Fabaceae). In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas da Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: 2006.
- PLANTAMED – **Plantas e Ervas Mediciniais e Fitoterápicos** Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna_alata.htm> Acesso em: 30 abr. 2007.
- POLHILL R.M.; RAVEN P.H. E STIRTON C.H. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: Polhill R.M. e Raven P.H., (eds.) **Advances in Legume Systematics part 1**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981. p.1-26.
- PUTNAM A.R. Allelochemicals from plants as herbicides. **Weed Technol.**, v. 2, p. 510-518, 1988.
- REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic Effects of 21 Plant Secondary Metabolites on *Arabidopsis thaliana* Germination and Root Growth. **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.1456–1466, 2007.
- REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. & GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.18, n.5, p. 577-608, 1999.
- RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, 1984. 422p.
- RIZVI, S.G.H.; RIZVI, V. (Eds.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 1992. 480p.
- SAMAPPITO, S.; PAGE, J.; DE-EKNAMKUL, J. S.W.; KUTCHAN, T. M. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. **Planta** v.216, p.64–71, 2002.
- SANTOS, R.N.; SILVA, M.G.V. Antraquinonas de *Senna reticulata* (Willd.). In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas da Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: 2006
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Autotoxicity: concept, organisms and ecological significance. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.18, n.6, p. 757-772, 1999

SONG, B.; XIONG, J.; FANG, C.; QIU, L.; LIN, R.; LIANG, Y.; LIN, W. Allelopathic Enhancement and Differential Gene Expression in Rice under Low Nitrogen Treatment **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p.688–695, 2008.

VALENCIA, E.; VALENZUELA, E.; BARROS, E.; HERNANDEZ, M.; LAZO, C.; GUTIERREZ, C.; GONZALEZ-COLOMA, A.; GONZALEZ, A.G.; BERMEJO, J. Estudio Fitoquímico y actividad antialimentaria de *Senna stipulaceae*. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, v.45, n.2, 2000.

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Senna alata* (L.) Roxb. POR DUAS METODOLOGIAS

RESUMO: *Senna alata* (L.) Roxb., mais conhecida como mata-pasto, na região Norte do Brasil é uma planta utilizada pela medicina popular em várias partes do mundo e considerada espécie problemática em pastagens do Estado do Pará. No presente estudo, comparou-se duas metodologias distintas para a determinação das principais classes de constituintes potenciais aleloquímicos das diferentes frações (caules, flores, folhas, raízes, sementes e vagens) de *S. alata*. O material vegetal foi seco e sofreu extração exaustiva com solvente hidrometanólico para obtenção dos extratos brutos, uma pequena parte desse foi solubilizada em metanol para a obtenção das soluções utilizadas nos testes fitoquímicos. As metodologias utilizadas foram: testes por cromatografia em camada delgada (CCD) para a determinação do perfil cromatográfico qualitativo; e ensaios para a detecção preliminar dos diferentes constituintes químicos, baseado na extração destes com solventes apropriados e na aplicação de testes de coloração. Os resultados em ambos os métodos demonstraram pouca semelhança, sendo a CCD o mais simples, barato, rápido e adequado para análise preliminar de compostos químicos derivados de plantas, embora seja um método qualitativo. Este método foi mais sensível para a detecção de flavonóides, porém, para a detecção de alcalóides o reativo de Bouchardat foi mais sensível do que o de Dragendorff, assim como o Hidróxido de amônia 10% foi mais sensível às antraquinonas do que o Hidróxido de potássio. O estudo comprovou a alta diversidade de compostos químicos presentes em *Senna alata*, justificando sua ampla utilização na medicina popular e indicando ainda o potencial alelopático para a sua utilização.

Palavras-chave: Aleloquímicos, Cromatografia em Camada Delgada, Fitoquímica, Leguminosae

ABSTRACT - Phytochemical study of *Senna alata* (L.) Roxb. by two methodologies: *Senna alata* (L.) Roxb., known as mata-pasto, in northern Brazil, is a plant used by the popular medicine in several parts of the world, and considered harmful problem specie in pastures of the Pará State. In the present study was compared two different methodologies to determine the main classes of potential allelochemicals of different fractions (stems, flowers, leaves, roots, seeds and pods) from *S. alata*. The plant material was dried and had been then submitted to exhaustive extraction with hydromethanolic solvent to obtain the crude extracts, part of this was soluble in

methanol to give the tests solutions. The methods used were: tests by thin-layer chromatography (TLC) to determine the quality chromatographic profile, and tests to preliminary detection of distinct chemical constituents, based on their extraction by appropriate solvents and application of color testing. The results of both methods demonstrated few similarities, and the TLC was the simplest, cheaper, faster and more appropriated for preliminary analysis of plants chemical compounds, although it is a qualitative method. This method was more sensitive for the flavonoids detection, however, the Bouchardat reactive was more sensitive for the alkaloids detection than the Dragendorff, as well as Ammonium hydroxide was more sensitive to anthraquinones than Potassium hydroxide. The study showed the high diversity of chemical compounds present in *Senna alata*, justifying their extensive use in popular medicine and even indicating their allelopathic use.

Key Words: Allelochemicals, Thin-layer chromatography, Phytochemistry, Leguminosae

INTRODUÇÃO

Na Região Amazônica, as áreas de pastagens cultivadas são infestadas, historicamente, por comunidade de plantas daninhas, que têm por características a alta diversidade biológica e a agressividade, sendo este um grande problema de ordem bioeconômica. Um bom exemplo de espécie considerada daninha é *Senna alata* (L.) Roxb., planta perene arbustiva, de crescimento rápido, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, conhecida popularmente como mata-pasto na Região Norte do Brasil. É freqüente em áreas de pastagens, arredores de estradas e terrenos baldios, em quase todo o Brasil, principalmente em lugares úmidos, como a região de Belém (Lorenzi, 2000; Plantamed, 2007). Basicamente, essas comunidades promovem dois tipos de interferências nos cultivos que infestam: alelospolia e alelopatia. A primeira é observada nos ecossistemas devido à competição por fatores indispensáveis a sobrevivência das espécies, enquanto a alelopatia é promovida por agentes químicos produzidos e liberados para o ambiente pelas próprias plantas (Souza Filho & Alves, 2002).

Teoricamente, todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar metabólitos secundários, como aleloquímicos. No entanto, essa característica é mais comum entre as plantas selvagens, que, ao longo do seu ciclo evolutivo, desenvolveram mecanismos de adaptação para competir com outras, assegurando sua sobrevivência quer pela formação de estandes puros, como, também, para defender-se de seus

inimigos naturais (Souza Filho & Alves, 2002). O potencial alelopático de extratos de *Senna alata* já foi investigado por Agbagwa et al. (2003), neste estudo demonstraram-se seus efeitos sobre a inibição do crescimento da radícula e o decréscimo consistente no percentual absoluto e na taxa de germinação de *Celosia argentea*.

Senna alata possui também propriedades terapêuticas, devendo ser ministrada com cuidado, pois é suspeita de ser tóxica aos rins e é, ainda, considerada abortiva (Lorenzi, 2000; Plantamed, 2007). Em Cuba, Camarões, no Brasil, na Índia e outros países, suas folhas, cascas, flores e raízes, podem ser utilizadas na medicina popular por suas propriedades antiherpética, febrífuga, antianêmica, antiblenorrágica, antinefrítica, antídota, antimicótica, diurética, parasiticida, laxante, e contra doenças de pele (Barrese Pérez & Hernández Jiménez, 2002; Awal et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Pieme et al., 2006; Plantamed, 2007).

Segundo Gupta & Singh (1991) espécies do gênero *Senna* são ricas em flavonóides, antraquinonas e polissacarídeos. Também já foram relatados para este gênero esteróides, alcalóides piperidínicos, isoquinolinas, cromonas, lactonas, estilbenos e triterpenos (Alemayehu & Abegaz, 1996; Alemayehu et al., 1998; Valencia et al., 2000).

A fitoquímica objetiva o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos vegetais, através do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. O crescente desenvolvimento de novas técnicas analíticas, como a cromatografia, e o constante aperfeiçoamento dos instrumentos de análise espectrométrica constituem a sua principal força motora. A seleção de plantas para estudo, geralmente, se baseia na prospecção e em relatos da literatura sobre ações antioxidantes, antiinflamatórias e inseticidas dos vegetais (Matos, 1997).

Desde muito tempo, a abordagem fitoquímica vem assumindo diferentes roupagens, ora mais simples ora mais complexa, mais específica ou mais geral. O teste por cromatografia em camada delgada (CCD) tem por objetivo a caracterização preliminar dos extratos pela determinação do perfil cromatográfico qualitativo onde se registra o número, a cor e a posição de manchas na placa (Rf) após a análise em sistemas diferentes de eluentes, associados aos reveladores específicos. A partir dessas avaliações, é possível determinar as classes de compostos que estão presentes nos extratos analisados para permitir a posterior correlação com resultados obtidos nos testes de atividade biológica (Wagner & Bladt, 1996; Gianvechio et al., 2006). Já o “screening” tradicional tem por objetivo a detecção e prospecção preliminar dos diferentes constituintes químicos de plantas, baseado na extração destes com solventes

apropriados e na aplicação de testes de coloração, ocorrendo algumas vezes, a formação de precipitados (Moreira, 1979; Lock de Ugaz, 1988; Matos, 1997).

Objetivou-se neste estudo, a identificação, por testes fitoquímicos, das principais classes de compostos potenciais aleloquímicos, encontradas em diferentes partes da espécie *Senna alata*. Realizou-se ainda a comparação de duas metodologias distintas para este fim: a cromatografia em camada delgada, e o “screening” padrão.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e processamento do Material Vegetal

Senna alata foi plantada no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na cidade de Belém, Pará. O plantio ocorreu em fevereiro de 2006. Uma amostra da espécie identificada por botânicos da mesma instituição foi depositada no herbário sob registro IAN 183561. Em dezembro de 2006, na fase reprodutiva, foram coletadas suas flores, vagens, sementes, raízes, folhas e caules. Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura constante de 40 °C, até atingir peso constante e então triturado em moinho tipo Willey até obtenção de um pó homogêneo.

Preparo dos extratos brutos

Para obtenção dos extratos brutos, realizou-se a extração exaustiva com mistura de solvente água/metanol (3:7) de cada parte da planta, por aproximadamente sete dias, com filtração e recolhimento periódicos do filtrado. Após esse período, o metanol foi eliminado a pressão reduzida, em rotavapor (BÜCHTEL131) à temperatura de 45 °C. Em seguida, a solução aquosa concentrada foi liofilizada.

Uma pequena parte do extrato bruto foi retirada e solubilizada em metanol para a obtenção das soluções utilizadas nos testes fitoquímicos (Wagner & Bladt, 1996; Matos, 1997).

Testes fitoquímicos

O primeiro teste realizado foi o descrito por Wagner & Bladt (1996) para a detecção de ácidos graxos, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides e terpenóides, via cromatografia em camada delgada.

Com o auxílio de tubos capilares de vidro os extratos foram aplicados na origem de 5 cromatoplasmas de sílica gel (ALUMINUM BACKED TLC, SILICA GEL, HARD LAYER, F-254, SAI) de dimensões 5 X 6 cm formando manchas semelhantes e

regulares. Três placas foram eluídas com mistura de solvente polar ácido (Acetato de etila: Ácido fórmico: Água 88:6:6). Uma placa foi eluída com mistura de solvente polar básico (Tolueno: Acetato de etila: Dietilamina 70:20:10) e uma com eluente apolar (Tolueno: Acetato de Etila 93:7). Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz de ultravioleta (UV), sendo registrados os resultados.

Visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes nos extratos retirados de diferentes estruturas da espécie *S. alata*, foram utilizados os seguintes reagentes (Wagner & Bladt, 1996; Gianvechio et al. 2006; Maciel et al., 2006):

- DRG (Reativo de Dragendorff) e ácido sulfúrico 10%, aplicados sobre a cromatoplaça eluída no sistema polar básico para a detecção de alcalóides (coloração amarronzada);
- NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol) aplicado sobre cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de cumarinas (azul-verde) e flavonóides (amarelo, laranja) sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365nm;
- KOH (hidróxido de potássio) aplicado sobre cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) sobre luz UV 365nm;
- VAS (Vanilina sulfúrica ácida) aplicada sobre cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de terpenóides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul);
- VAS (Vanilina sulfúrica ácida) aplicada sobre cromatoplaça eluída no sistema apolar para a detecção de terpenóides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul).

Os aspectos considerados foram cor e altura antes e após exame com luz UV e mudanças de coloração com o uso de reveladores.

- Cor: dependendo da tonalidade predominante, a cor da imagem em conjunto se define como vivamente colorida, pouco colorida ou muito pouco colorida;
- Mudanças de coloração: a imagem capilar foi exposta a reagentes sobre ela gotejados ou borrifados e as mudanças de coloração foram observadas e registradas;
- Exame com luz ultravioleta: depois da corrida, a cromatoplaça é exposta à luz UV 365 nm. Foram observadas e registradas as fluorescências das diferentes zonas da imagem e suas intensidades.

O segundo teste realizado foi o “screening” ou prospecção fitoquímica descrita no Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental, aplicado no setor de plantas medicinais do Laboratório de Agroindústria. Este procedimento utiliza técnicas descritas por Moreira (1979); Lock de Ugaz (1988); Matos (1997) (Tabela 1).

Além dos constituintes testados nos procedimentos anteriores foram também acrescentados os testes para taninos, catequinas, saponinas e depsídeos.

Tabela 1: Testes de prospecção fitoquímica de classes químicas de plantas.*

Constituinte químico	Reagente	Reação positiva
Taninos	Solução aquosa de cloreto férrico a 1%	Mudança de coloração ou formação de precipitado.
Catequinas	Solução aquosa de vanilina 1% e ác. clorídrico concentrado	Coloração vermelha intensa.
Flavonóides	Ác. Clorídrico concentrado e fita de Mg	Coloração rósea.
Esteróides e Triterpenóides	Clorofórmio, anidrido acético e ác. Sulfúrico concentrado	Sucessão de cores, de azul evanescente a verde persistente.
Depsídios	Metanol e solução aquosa de cloreto férrico 1%	Coloração verde, azul ou cinza.
Cumarinas	Solução aquosa de NaOH 1 mol L ⁻¹ em papel filtro.	Fluorescência azul sobre luz UV
Saponinas	Solução hidroalcolica 80GL: etanol comercial/água destilada.	Camada de espuma estável por mais de 30 minutos.
Alcalóides	Reativo de Bouchardat	Precipitado laranja avermelhado.
Antraquinonas	Benzeno e solução aquosa de hidróxido de amônio 10%	Coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa.

* “Screening” fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental

Todos os processos de extração, preparo de soluções e screening foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Os testes em cromatoplasas de camada delgada foram realizados no Laboratório de Química da Universidade Federal do Pará.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da Cromatografia em Camada Delgada pode ser verificado na Tabela 2. Neste caso, a idéia foi verificar a presença ou não de alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, terpenóides e ácidos graxos.

Tabela 2: Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos extratos das diferentes partes de *Senna alata* pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD)

Classes químicas	Extratos Brutos Hidrometanólicos de <i>Senna alata</i>					
	Caules	Flores	Folhas	Raízes	Sementes	Vagens
Ácidos graxos	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	+	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	+	+	+	+	+	+
Terpenóides	-	-	-	-	-	-

+ (Positivo); - (Negativo)

Pelos resultados expostos, observa-se que cumarinas, flavonóides e ácidos graxos podem ser encontrados em todos os pontos da planta *Senna alata*. Antraquinonas foram detectadas somente nas folhas pelo teste com hidróxido de potássio. E ainda, as estruturas da planta que apresentaram maior diversidade de classes químicas, segundo o teste em CCD foram as folhas, podendo esta diversidade refletir em um maior potencial de utilização em ensaios de alelopatia.

Já os ensaios para a detecção e prospecção preliminar dos diferentes constituintes químicos de plantas, baseado no “Screening” fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental forneceu os resultados expostos na Tabela 3.

Tabela 3: Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos extratos das diferentes partes de *Senna alata* pelos métodos de prospecção fitoquímica de classes químicas*

Classes químicas	Extratos Brutos Hidrometanólicos de <i>Senna alata</i>					
	Caules	Flores	Folhas	Raízes	Sementes	Vagens
Alcalóides	+	+	+	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+	+	+	+
Catequinas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	M	+	+	-
Depsídios	+	-	M	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	M	+	+	+	+
Taninos	M	-	+	M	M	-
Esteróides e triterpenóides	-	-	-	-	-	-

* “Screening” fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental

+ (Positivo); - (Negativo); M (Mascarado)

Os resultados do “screening” mostram que alcalóides e antraquinonas foram encontrados em todas as estruturas da planta, ao contrário do teste por CCD, indicando que, para a detecção de alcalóides o reativo de Bouchardat foi mais sensível do que o reativo de Dragendorff, assim como o hidróxido de amônia 10% foi mais sensível às antraquinonas do que o hidróxido de potássio. Flavonóides não foram detectados utilizando-se ácido clorídrico concentrado e fita de Magnésio, demonstrando que o NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol) é mais apropriado para a detecção desta classe química. Da mesma forma, cumarinas só foram detectadas em raízes e sementes, sendo o hidróxido de potássio mais apropriado do que a solução aquosa de hidróxido de sódio. As folhas foram as únicas estruturas em que a presença de taninos foi confirmada. E contando com o resultado suspeito (mascarado) para cumarinas e depsídios nas folhas, novamente, representaram a porção da planta que apresentou maior diversidade de classes químicas, como no teste em CCD. Saponinas também foram encontradas em praticamente todas as partes da planta.

Comparando-se as duas metodologias, poucos resultados foram corroborados, indicando que talvez a mistura de solvente água/metanol (3:7) utilizada na fase de extração não tenha sido a mais apropriada para algumas classes de compostos ou que a especificidade dos reagentes reveladores seja diferente para as mesmas concentrações. Tais resultados podem ainda estar relacionados à presença de intensa mistura de compostos e/ou à concentração muito baixa do constituinte a ser pesquisado nos tecidos da planta.

Os resultados obtidos na cromatografia de camada delgada demonstraram que é o método qualitativo mais adequado para uma análise preliminar de compostos químicos derivados de plantas, devido a economia, rapidez, simplicidade e maior segurança de manuseio do processo. Porém, devem ser adicionados a esta metodologia mais testes para a abrangência de um maior número de classes, como no “screening”. Segundo Gianvechio et al. (2006) e Wagner & Bladt (1996), dentre as duas metodologias utilizadas, a cromatografia em camada delgada é considerada de fácil e rápida execução, custo acessível, reprodutível, e consta em diversas monografias das Farmacopéias, é um método muito empregado uma vez que fornece dados para a identificação de matérias primas vegetais, além de permitir inferências a respeito da pureza do material.

Neste trabalho, foram identificadas em todas as partes de *Senna alata* algumas classes químicas já consagradas pela atividade alelopática (Rice 1984; Putnam & Tang 1986; Moreland & Novitzky 1987; Arruda et al. 2005; Cipollini 2008). Porém classes como catequinas, esteróides e terpenóides, consideradas agentes alelopáticos potentes (Rice 1984; Fischer et al. 1994; Lôbo et al. 2008; Macías 2008), não foram encontradas. É reconhecido que as plantas produzam e estocam seus metabólitos em diferentes partes, sendo a principal fonte uma variável não fixa, que pode flutuar entre espécies ou dentro de uma mesma espécie, e ainda sofrer variações de acordo com as condições ambientais (Souza Filho & Alves, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Barresse - Pérez et al. (2005) no estudo fitoquímico da mesma espécie, onde também foram verificadas diferenças na detecção de constituintes químicos quando o solvente de extração foi modificado e até mesmo quando utilizavam-se reagentes reveladores distintos. Entre os componentes até então identificados em *Senna alata*, por diferentes métodos fitoquímicos de prospecção, estão presentes taninos, triterpenos, esteróides, alcalóides, carboidratos redutores, flavonóides, saponinas, cumarinas, antocianidinas, emodina, antraquinona, chrysarabina, ribarina, ácido málico, tartárico, crisofânico e

óleo essencial (Barrese Pérez & Hernández Jiménez, 2002; Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Plantamed, 2007). Suas flores são ricas em flavonóides e vitamina C (Plantamed, 2007).

Neste estudo fitoquímico foi comprovada a alta diversidade de compostos químicos presentes em todas as estruturas de *Senna alata*, principalmente em suas folhas, justificando assim sua ampla utilização na medicina popular e indicando ainda o potencial para a utilização em outras áreas como a alelopatia. Ainda, a cromatografia em camada delgada, devido à economia, rapidez, simplicidade e maior segurança do processo é o método qualitativo mais indicado para a análise preliminar de compostos químicos derivados de plantas, como por exemplo, potenciais classes de aleloquímicos.

LITERATURA CITADA

- AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F.A.; MENSAH, S.I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Appl. Sci. Environ. Manag.**, v.7, n.1, p.9-13, 2003.
- ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B. M. Bianthraquinones from the seeds of *Senna multiglandulosa*. **Phytochemistry**, v.41, n. 3, p.919-921, 1996.
- ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B.; KRAUS W.A. 1-4, anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. **Phytochemistry**, v.48, n.4, p.699-702, 1998.
- ARRUDA, M.S.P.; ARRUDA, A.C.; LÔBO, L.T.; SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M.; SANTOS, L.S.; MÜLLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Potential allelochemicals isolated from *Pueraria phaseoloides*. **Allelopathy J.** v.15, n.2, p.211-220, 2005.
- AWAL, M. A.; NAHAR, A.; HOSSAIN, M. S.; BARI, M. A.; HAHMAN, M.; HAQUE, M. E. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. **J. Med. Sci.**, v.4, n.3, p.188-193, 2004.
- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E. Tamizaje fitoquímico de la droga y extracto fluido de la gacamaya francesa. **R. Cub. Plant. Med.**, v.7, n.3, p.1-4, 2002.
- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E.; PULPEIRO, O. G. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 10, n. 2, p .1-5, 2005.
- CIPOLLINI, D.; STEVENSON, R.; ENRIGHT, S.; EYLES, A.; BONELLO, P. Phenolic Metabolites in Leaves of the Invasive Shrub, *Lonicera maackii*, and Their

- Potential Phytotoxic and Anti-Herbivore Effects. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 144–152, 2008.
- FISCHER, N.H. et al. In search of allelopathy in the Florida scrubs: the role of terpenoids. **J. Chem. Ecol.**, v.20, n.6, p.1355-1380, 1994.
- GIANVECHIO, C. M.; PRUDENTE, L.R.; PEREIRA, A.C.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **R. Eletrôn. Farm.** v.3, n.2, p.53-62, 2006.
- GUPTA, D.; SINGH, J. Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2761- 2763, 1991.
- LÔBO, L.T.; CASTRO, K.C.F.; ARRUDA, M.S.P.; SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, A.S.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Quim. Nova**, v.31, n.3, p.493-497, 2008.
- LOCK de UGAZ, O. **Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales**. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, 1988. p. 1- 7.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 608p.
- MACÍAS, F. A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G. Helikauranoside A, a New Bioactive Diterpene. **J. Chem. Ecol.**, v.34, p.65–69, 2008.
- MACIEL, R.L., MOREIRA-CAMPOS, L.M., SILVA, B. C.; BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, n.1, p.99-104. 2006.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.
- MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Trib. Farmac.**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.
- MORELAND, D.E.; NOVITZKY, W.P. Effects of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. In: WALLER, G.R. (Ed.). **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. Washington: American Chemical Society, 1987. p.247-261.
- ORDOÑEZ, M. G.; GOVÍN, E. S.; BLANCO, M. de los A. G. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. **Rev. Cub. Plant. Med.**, v.9, n.1, p.0-0, 2004.

- PIEME, C. A.; PENLAP, V. .N; NKEGOUM, B.; TAZIEBOU, C.L.; TEKWU, E.M.; ETOA, F. X.; NGONGANG, J. Evaluation af acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Caesalpinaceae). **Afric. J. Biotechnol.**, v.5, n.3, p.283-289, 2006.
- PLANTAMED – **Plantas e Ervas Medicinais e Fitoterápicos** Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna_alata.htm> Acesso em: 30 abr. 2007.
- PUTNAM, A. R.; TANG, C.S. *Allelopathy: state of the science*. In: **The Science of Allelopathy**. Toronto: John Wiley & Sons, 1986. p. 1-19.
- RICE,E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, 1984. 422p.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia – princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 260p
- VALENCIA, E.; VALENZUELA, E.; BARROS, E.; HERNANDEZ, M.; LAZO, C.; GUTIERREZ, C.; GONZALEZ-COLOMA, A.; GONZALEZ, A.G.; BERMEJO, J. Estudio Fitoquímico y atctividad antialimentaria de *Senna stipulaceae*. **Bol. Soc. Chil. Quím.** v.45, n.2, 2000.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Cromatography Atlas**- 2 ed. Berlim: Springer, 1996. 384p.

**EFEITOS ALELOPÁTICOS E AUTOTÓXICOS DE EXTRATOS
HIDROMETANÓLICOS DE DIFERENTES ESTRUTURAS DA ESPÉCIE *Senna
alata* (L.) Roxb.**

RESUMO: Um dos aspectos mais explorados da alelopatia, em ecossistemas manipulados, é o seu papel na agricultura. Atualmente, o potencial alelopático de várias plantas tem sido avaliado como método de controle alternativo, reduzindo o uso intensivo de herbicidas, que pode acarretar problemas ambientais e de saúde. Objetivou-se neste estudo a avaliação da atividade alelopática de diferentes partes da espécie daninha *Senna alata* (L.) Roxb. (mata-pasto), frequente em áreas de pastagens na região Amazônica. Para o exame de seu potencial alelopático, aplicaram-se extratos hidrometanólicos de suas diferentes estruturas sobre a germinação de sementes e o alongamento da radícula e hipocótilo de duas espécies daninhas de áreas de pastagens: *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, da forrageira *Pueraria phaseoloides* e da própria *S. alata*. Os tratamentos constaram dos extratos de flores, vagens, sementes, raízes, folhas e caules na concentração de 1%, obtidos por extração exaustiva com solvente hidrometanólico (3:7), por 7 dias. Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, onde foram desenvolvidos com temperatura e fotoperíodos controlados. O extrato de folhas apresentou maior atividade alelopática, inibindo até 95% a germinação das espécies mais sensíveis. A espécie mais sensível, nos bioensaios de germinação e desenvolvimento da radícula foi a congênica *S. obtusifolia*. *P. phaseoloides* mostrou ser a menos sensível aos efeitos dos extratos hidrometanólicos sobre a inibição da germinação de sementes e crescimento do hipocótilo. Os resultados indicam que o sítio de maior biossíntese de aleloquímicos em *S. alata*, encontra-se em suas folhas. Quanto aos efeitos autotóxicos dos extratos de *S. alata*, estes são somente percebidos durante o crescimento inicial da plântula, afetando em maior parte o seu sistema radicular.

Palavras-chave: Leguminosae, Alelopatia, Plantas daninhas

ABSTRACT - Allelopathic and autotoxic effects of hydromethanolic extracts from different structures of *Senna alata* (L.) Roxb.: One of the most important aspects of allelopathy, in manipulated ecosystems, is its role in agriculture. Currently, the allelopathic potential of diverse species has been evaluated as an alternative control method, reducing the intensive use of herbicides, which can cause environmental and health problems. The study objective was the evaluation of the allelopathic activity of

different parts of harmful *Senna alata* (L.) Roxb. (kill-grass), frequent specie in pastures of Amazon region. With this aim, hydromethanolics extracts of different fractions of *S. alata* were applied on the seed germination and radicle and hypocotyl elongation of two pastures weeds: *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*, and one forage legume *Pueraria phaseoloides*, and *Senna alata* itself. The treatments consisted of flowers, pods, seeds, roots, leaves and stems extracts, in the concentration of 1%, given by exhaustive extraction with hydromethanolic solvent (3:7), for 7 days. The bioassays were carried out on The Agroindustry Laboratory of the Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, with temperature and photoperiod controlled. The leaf extract presented the greater allelopathic activity, showing inhibition about 95% on the sensible species, in germination test. The species most sensible, in the bioassays of germination and radicle elongation was *S. obtusifolia*. *P. phaseoloides* showed to be the less sensible to the effect of hydromethanolic extracts on the inhibition of seed germination and hypocotyl elongation. The results indicate that the major site of allelochemicals biosynthesis in *S. alata*, is found in their leaves. About the autotoxic effects of *S. alata* extracts, they are observed only in the early growth of seedlings, affecting mostly their root system.

Key words: Leguminosae, Allelopathy, Weeds

INTRODUÇÃO

Na Região Amazônica, as áreas de pastagens cultivadas são infestadas, historicamente, por comunidade de plantas daninhas, que têm por característica a alta diversidade biológica e a agressividade, constituindo-se no principal problema de ordem bioeconômica a limitar o desempenho produtivo e a rentabilidade da atividade agrícola. Levantamento de comunidades de plantas infestantes, realizado em fazendas localizadas no Nordeste Paraense, aponta a ocorrência de 17 famílias e 36 espécies como as mais endêmicas (Modesto Júnior & Mascarenhas, 2001). Entre as famílias já catalogadas nas principais regiões com atividades agrícolas, Leguminosae merece destaque pelo elevado número de espécies incidentes, com aproximadamente 43 (Dantas & Rodrigues, 1980). Basicamente, essas plantas promovem dois tipos de interferências nos cultivos que infestam: alelospolia e alelopatia. Alelospolia refere-se às interferências decorrentes da competição por fatores indispensáveis a sobrevivência de cada espécime, como água, luz, nutriente e espaço físico, enquanto alelopatia diz respeito às interferências promovidas pela produção e liberação, para o ambiente, de compostos químicos que uma vez absorvidos pelas plantas, em suas vizinhanças, afetam processos fisiológicos e metabólitos, comprometendo a capacidade competitiva da espécie atingida. Conquanto

os conceitos alelospolia e alelopatia permitam a distinção teórica entre eles com certa facilidade, em condições de campo é muito difícil distinguir que parcela da interferência observada se deve a cada um desses fatores (Souza Filho & Alves, 2002).

A formação de estandes puros e sua adaptabilidade ecológica podem estar relacionadas ainda, ao fenômeno da autotoxicidade. Também conhecido como auto-alelopatia, a autotoxicidade ocorre quando a planta libera uma substância química no ambiente que inibe a germinação e o crescimento de outras plantas da mesma espécie. Sua ocorrência tem sido observada, tal como a alelopatia, em ecossistemas naturais ou agrícolas, onde promove diversas implicações ecológicas e econômicas (Souza Filho & Alves, 2002).

Atualmente, o potencial alelopático de várias plantas é considerado importante componente na estratégia de controle alternativo para reduzir o intensivo uso de herbicidas sintéticos em culturas, que pode acarretar problemas ambientais e de saúde (Rizvi & Rizvi, 1992).

Dentre as muitas espécies de Leguminosae que ocorrem na Região Amazônica, merecem destaque pelos prejuízos que promovem em áreas de pastagens da região, aquelas pertencentes ao gênero *Senna*, em especial *Senna alata* (L.) Roxb., vulgarmente conhecida como mata-pasto ou fedegoso, espécie perene, de crescimento rápido, com porte arbustivo-arbóreo, podendo atingir até 6,0 m. de altura. Em inventário florístico realizado em vegetação secundária, na região Bragantina, a leste de Belém do Pará, *S. alata* foi encontrada entre os indivíduos de Leguminosae, a família representada pelo maior número de espécies (Baar et al., 2004).

Este trabalho teve por objetivo analisar e caracterizar a atividade potencial alelopática e autotóxica das diferentes estruturas da espécie *Senna alata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e processamento de material vegetal:

A espécie *Senna alata* foi plantada em fevereiro de 2006, no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na cidade de Belém, Pará. A coleta foi realizada com as plantas na fase reprodutiva, em dezembro de 2006, quando foram colhidas e separadas nas seguintes frações: caules; flores; folhas; raízes; sementes e vagens. O material vegetal foi seco em estufas de circulação de ar forçada, à temperatura constante de 40 °C, durante 72 horas. Em seguida, os materiais foram triturados, em moinho tipo Willey, até obtenção de um pó homogêneo.

Preparo dos extratos brutos

Para obtenção dos extratos brutos, realizou-se a extração exaustiva com mistura de solvente água/metanol (3:7) de cada parte da planta, por aproximadamente sete dias, com filtração e recolhimento periódicos do filtrado. Após esse período, o metanol foi eliminado a pressão reduzida, em rotavapor (BÜCHTEL131) à temperatura de 45 °C. Em seguida, a solução aquosa concentrada foi liofilizada.

Espécies receptoras utilizadas nos bioensaios:

As espécies receptoras utilizadas nos bioensaios de germinação e crescimento inicial foram:

- puerária, *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth.;
- malícia, *Mimosa pudica* L.;
- mata-pasto liso, *Senna obtusifolia*(L.) H.S. Irwin & Barneby;
- a espécie doadora *Senna alata*, no caso do bioensaio autotóxico.

Bioensaios de germinação:

A germinação das espécies receptoras foi monitorada em períodos de 10 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (Juntilla, 1976; Duram & Tortosa, 1985). Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro foi forrada com uma folha de papel filtro qualitativo e recebeu 25 sementes de cada espécie receptora. Os bioensaios foram desenvolvidos em estufas de germinação do tipo BOD Modelo 3740 (Forma Scientific, Inc. BOX 649 MARIETTA, OHIO 45750), em condições controladas de 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas.

Bioensaios de crescimento inicial:

Os bioensaios de crescimento da radícula e do hipocótilo foram realizados nas mesmas condições dos bioensaios de germinação, com a diferença apenas no tocante ao fotoperíodo, que neste caso foi de 24 horas. Cada placa de Petri, forrada com papel de filtro qualitativo, recebeu três plântulas, de medidas uniformes, com aproximadamente três dias de germinação. Ao final do período de 10 dias de crescimento, o comprimento da radícula e do hipocótilo foram mensurados.

Outros procedimentos experimentais:

Todos os extratos foram testados em concentração única de 1,0% (p/v), tendo como eluente mistura de solvente água/metanol (3:7). Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL de extrato, sendo adicionado apenas uma vez, quando do início de cada bioensaio. A partir de então foi adicionado, apenas, água destilada, sempre que preciso. Após a adição do extrato, deixou-se evaporar o solvente e adicionou-se 3,0 mL de água destilada, mantendo-se, dessa forma, a concentração original. Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Osmolaridade

Em estudos de avaliação da atividade alelopática envolvendo o uso de extratos brutos, o fator potencial osmótico merece atenção especial, em função do fato de que alelopatia e atividade osmótica têm efeitos aditivos. A atividade osmótica de um dado extrato bruto depende, primariamente, da concentração do extrato bruto utilizado em teste, ou seja, quanto maior for a concentração do extrato maior deve ser a atividade osmótica (Souza Filho & Alves, 2000). Dessa forma, o potencial osmótico tende a superestimar a atividade alelopática, havendo, por conseguinte a necessidade de se isolar esse efeito da atividade alelopática. Para a concentração de 1,0%, empregada neste trabalho, a contribuição do potencial osmótico foi desprezada, conforme apresentado por Souza Filho & Alves (2000).

Delineamento experimental e análise estatística:

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, em modelo tipo hierárquico com dois fatores. Os dados foram submetidos à análise da variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando a diferença mínima significativa ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram processadas, utilizando-se o programa SAS (SAS, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o extrato de folhas foi o que apresentou maior atividade alelopática, inibindo acima de 90% a germinação de sementes das plantas daninhas e 70% a forrageira puerária (Tabela 1). A espécie mais sensível aos efeitos dos extratos hidrometanólicos do mata-pasto foi a *Senna obtusifolia*, seguida de *Mimosa pudica*, apresentando ambas, em geral, acima de 80% da germinação de suas sementes inibidas.

A espécie *Pueraria phaseoloides* foi a que apresentou menor sensibilidade à ação inibitória dos extratos sobre a germinação de sementes, com exceção do extrato foliar.

Tabela 1. Efeitos de diferentes extratos de estruturas de mata-pasto (*S. alata*) sobre a germinação de sementes de diferentes plantas de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha.

Fonte	Espécie receptora		
	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>	<i>P. phaseoloides</i>
Sementes	84,0Ba	83,0Ba	18,0Eb
Vagens	72,0Cb	78,0Ca	57,0Bc
Flores	85,0Ba	87,0Ba	36,0Db
Caules	80,0Ba	83,0Ba	57,0Bb
Folhas	93,0Aa	95,0Aa	70,0Ab
Raízes	38,0Dc	80,0Ca	44,0Cb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Os extratos de sementes, flores e caules produziram efeitos semelhantes sobre *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, inibindo acima de 80% a germinação de sementes destas espécies (Tabela 1). Para *M. pudica* o extrato das raízes foi o menos ativo e para *S. obtusifolia* e *Pueraria phaseoloides*, os extratos que provocaram menor inibição foram vagens e sementes, respectivamente (Tabela 1). Ainda os extratos de vagens e caules produziram o mesmo percentual de inibição de sementes sobre *P. phaseoloides*.

A partir da análise da tabela 2, observou-se que, mais uma vez o extrato de folhas foi o mais ativo no bioensaio de crescimento da radícula e do hipocótilo, com exceção da ação do extrato de caules sobre o crescimento do hipocótilo de *Pueraria phaseoloides*. Os efeitos inibitórios foram mais acentuados, percentualmente, sobre o crescimento da radícula e a espécie mais afetada foi novamente *Senna obtusifolia*, seguida por *P. phaseoloides*, enquanto *Mimosa pudica* foi a espécie menos sensível à ação dos extratos sobre o crescimento da radícula. Já no bioensaio de alongamento do hipocótilo, a espécie mais sensível foi *M. pudica*, seguida de *S. obtusifolia*, sendo *P. phaseoloides* a menos sensível.

Tabela 2. Efeitos de diferentes extratos de frações de mata-pasto (*S. alata*) sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de diferentes plantas de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha.

Hipocótilo				Radícula		
Fonte	Espécie receptora					
Extrato	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Pueraria phaseoloides</i>
Sementes	17,0Da	14,0Cb	10,0Bb	30,0Cb	58,0Ca	58,0ABa
Vagens	25,0Ca	12,0Cb	4,0Cc	42,0Bc	66,0Ba	58,0ABb
Flores	31,0Ba	11,0Cb	5,0Cc	38,0Bb	54,0Ca	41,0Db
Caules	35,0Ba	27,0Ab	20,0Ac	31,0Cc	64,0Ba	56,0Bb
Folhas	43,0Aa	31,0Ab	8,0Bc	51,0Ac	70,0Aa	64,0Ab
Raízes	33,0Ba	21,0Bb	7,0Bc	34,0BCb	47,0Da	49,0Ca

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Ainda em análise da tabela 2, verificou-se que os extratos de sementes, raízes e flores foram os que apresentaram menor atividade sobre *M. pudica*, *S. obtusifolia* e *P. phaseoloides*, respectivamente, para o experimento de crescimento da radícula. No caso do crescimento do hipocótilo, os extratos menos ativos sobre essas espécies, nessa ordem, foram os obtidos a partir de sementes, flores e vagens.

Segundo Ferreira & Àquila (2000), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Porém, os resultados (Tabelas 1 e 2), mostram que os extratos das diferentes frações de *S. alata* apresentaram maior efeito inibitório sobre a germinação do que sobre o alongamento da radícula e hipocótilo, contrariando a afirmação anterior. A alta taxa de inibição sobre a germinação das sementes das espécies receptoras causada pelos extratos de *S. alata* é resultado da inibição da divisão das células dos meristemas embrionários das sementes (Agbagwa et al., 2003).

Analisando-se os efeitos autotóxicos, nos testes de germinação de sementes observou-se que os percentuais de inibição dos extratos obtidos a partir das diferentes estruturas de *S. alata* foram baixos, por volta de 3 % (Tabela 3), e não houve diferenças entre eles. Já nos bioensaios de alongamento da radícula e hipocótilo, a partir da análise da tabela 3, observou-se que o extrato de folhas foi o mais ativo apresentando 74% de

auto-inibição sobre o crescimento da radícula e, 58% sobre o alongamento do hipocótilo. Verificou-se ainda, que os extratos de vagens e caules foram os que apresentaram menor atividade sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo, nesta ordem.

Tabela 3. Efeitos auto-inibitórios de extratos hidrometanólicos de diferentes frações da planta de *S. alata*. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Fonte	Bioensaios		
	Germinação	Cresc. radícula	Cresc. hipocótilo
Sementes	3,0Ab	53,0Ca	53,0Ba
Vagens	3,2Ab	48,0Da	49,0Ca
Flores	3,0Ac	67,0Ba	50,0Bb
Caules	2,8Ac	69,0Ba	42,0Db
Folhas	2,5Ac	74,0Aa	58,0Ab
Raízes	2,8Ac	57,0Ca	50,0Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

No caso dos efeitos autotóxicos de *Senna alata*, observa-se, ao contrário dos efeitos alelopáticos sobre outras espécies, que a inibição sobre a germinação é menos acentuada e não significativa, quando comparada aos efeitos sobre o alongamento da radícula e do hipocótilo. É provável que esta seja uma estratégia para evitar a autotoxicidade nos estágios iniciais, permitindo a produção de sementes viáveis, dentro da população, mas impedindo uma expansão muito acelerada no crescimento dos novos indivíduos.

Reigosa et al. (1999) cita que uma inibição autotóxica exibida no centro de comunidades de espécies perenes que crescem bastante adensadas, pode promover uma expansão vegetativa e produção de sementes nas margens desta comunidade, aumentando assim a colonização de novos habitats. Embora um grande número de plantas produza aleloquímicos tanto quanto autoquímicos, algumas delas desenvolveram mecanismos para evitar essa autotoxicidade. Métodos para superar os riscos de autotoxicidade podem variar até mesmo dentro da planta, e pode ser manifestado por todo o organismo, em órgãos e tecidos específicos, ou em diferentes níveis subcelulares e moleculares (Singh et al., 1999).

Na Figura 1 é possível observar os efeitos dos extratos hidrometanólicos de *Senna alata* sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo de duas espécies de plantas daninhas, uma forrageira e sobre si mesma.

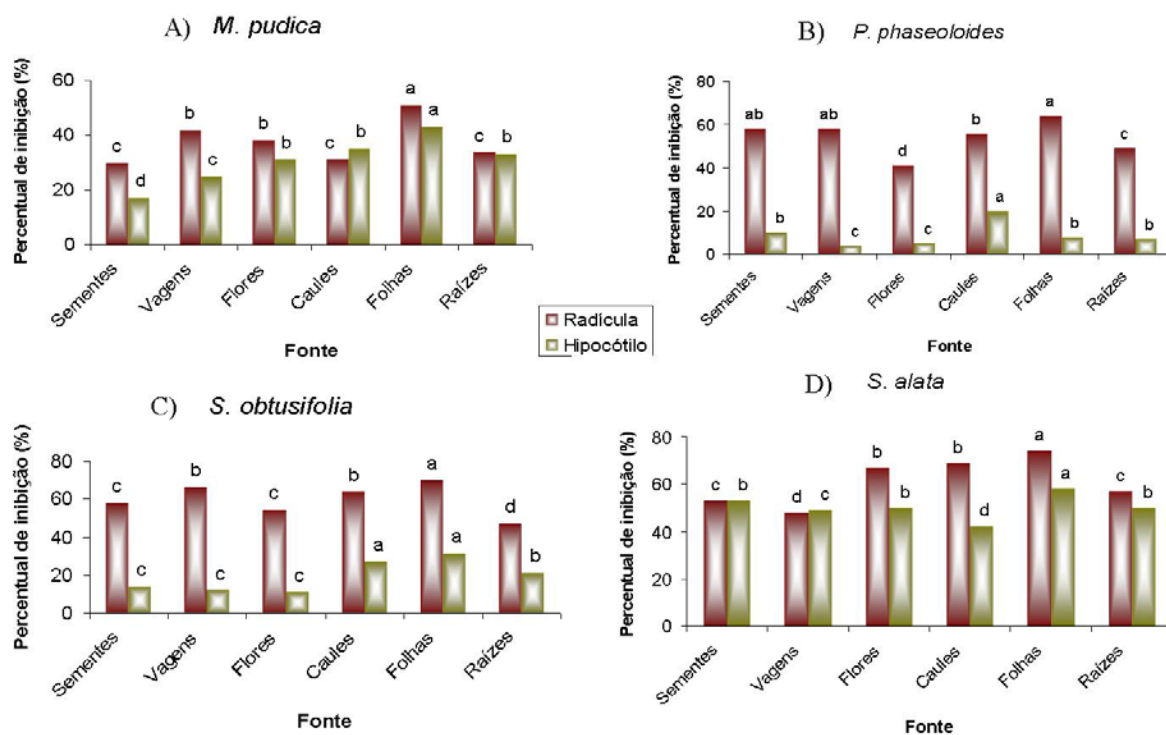


FIGURA 1: Efeitos de extratos hidrometanólicos de *S. alata* sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de diferentes espécies.

Foi demonstrado que, no geral, os extratos produziram efeitos mais acentuados sobre o crescimento da radícula (Figura 1). É notório, confirmando os resultados discutidos anteriormente, que cada espécie respondeu da sua maneira, com relação aos diferentes extratos utilizados e às estruturas afetadas. Está claramente representada, também na Figura 1, a superioridade dos efeitos autotóxicos de *Senna alata*, principalmente com relação aos efeitos sobre o alongamento do hipocótilo.

Alelopatia é importante e decisivo mecanismo de interferência promovida por plantas daninhas em agroecossistemas, com influência na dinâmica, densidade e padrão da vegetação. O número de plantas daninhas já catalogadas, por sua atividade alelopática, é expressivo e foi recentemente revisado por Souza Filho (2006). É reconhecido que as plantas produzam e estocam seus metabólitos em diferentes partes, sendo a principal fonte uma variável não fixa, que pode flutuar entre espécies ou dentro de uma mesma espécie, e ainda sofrer variações de acordo com as condições ambientais, além disso, a distribuição destas substâncias na planta não é uniforme, tanto

no aspecto qualitativo como quantitativo (Souza Filho & Alves, 2002). Portanto os agentes químicos envolvidos nesse tipo de interferência, os aleloquímicos, assumem papel importante e nesse contexto, o ciclo das plantas pode ter importância especial.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a existência de um padrão diferenciado de síntese e/ou conteúdo de substâncias alelopáticas e autotóxicas nas diversas partes da planta *Senna alata*, e que provavelmente o sítio de maior biossíntese esteja situado em suas folhas. Os efeitos inibitórios sobre outras espécies são mais acentuados sobre a germinação das sementes do que sobre o crescimento inicial. Apresentando tendência contrária, os efeitos autotóxicos dos extratos hidrometanólicos de *S. alata*, são somente percebidos no crescimento inicial da plântula, afetando em maior parte a porção subterrânea desta, podendo indicar um provável mecanismo de adaptação ou tolerância à autotoxicidade para a formação de estandes puros.

LITERATURA CITADA

- AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F.A.; MENSAH, S.I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Appl. Sci. Environ. Manag.**, v.7, n.1, p.9-13, 2003.
- BAAR, R.; CORDEIRO, M. dos R.; DENICH, M.; FOLSTER, H. Floristic inventory of secondary vegetation in agricultural systems of East-Amazonia. **Biodiv. Conserv.**, v. 13, p. 501–528, 2004.
- DANTAS, M.; RODRIGUES, I. A. **Plantas invasoras de pastagens cultivadas na Amazônia**. Belém: Embrapa-CPATU, 1980. 23p. (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 1).
- DURAM, J.M.; TORTOSA, M.E. The effect of mechanical and chemical scarification of charlock (*Sinapsis arvensis*) seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.13, n.1, p.155-163, 1985.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **R. Bras. Fis. Veg.**, v.12 (Edição especial), p.175-204, 2000.
- JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physio. Plant.**, v.29, p.264-268, 1976.
- MODESTO JÚNIOR, M.S.; MASCARENHAS, R.E.B. Levantamento da infestação de plantas daninhas associadas a uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense. **Planta Daninha**, v.19, n.1, p.11-21, 2001.
- REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.18, n.5, p. 577-608, 1999.

- RIZVI, S.G.H.; RIZVI, V. (Eds.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 1992. 480p.
- SINGH, H.P; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Autotoxicity: concept, organisms and ecological significance. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.18, n.6, p. 757-772, 1999.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia – princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 260p.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Potencial alelopático de plantas de acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v.18, n.3, p.435-441, 2000.
- SOUZA-FILHO, A.P.S. **Alelopatia e as Plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2006. 159p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. **User's guide**. Version 6.4. Cary: 1989. 846p.

PROSPECÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Senna alata* (L.) Roxb. COM ATIVIDADE ALELOPÁTICA

RESUMO: *Senna alata* (L.) Roxb. é uma espécie daninha freqüente em pastagens da região Amazônica. Suas folhas apresentam propriedades medicinais. Objetivou-se neste estudo a prospecção química e a avaliação da atividade alelopática dos compostos presentes nas folhas de *S. alata*. O material vegetal foi seco, triturado e submetido a extração exaustiva, com solução água:metanol (3:7). O extrato obtido foi então fracionado por coluna cromatográfica por via úmida. As frações mais puras foram submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, para a determinação das fórmulas estruturais das moléculas. Para a avaliação dos efeitos das substâncias químicas isoladas, utilizaram-se as concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm, tendo como eluente solução hidrometanólica (3:7 v/v). As frações foram adicionadas em placas de Petri e seus efeitos avaliados sobre a germinação de sementes e o alongamento da radícula e hipocótilo de duas espécies daninhas também de áreas de pastagens: *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, e da própria *S. alata*. Os compostos com atividade alelopática encontrados em folhas de *S. alata* pertencem à classe dos flavonóides glicosilados, cujo núcleo aromático é um kaempferol, e causaram maior inibição sobre o crescimento da radícula e sobre a germinação de *S. obtusifolia* e *M. pudica*. Já os efeitos autotóxicos deste composto são pouco significativos para o desenvolvimento da plântula e nulos sobre a germinação.

Palavras-chave: Leguminosae, Aleloquímicos, RMN, Flavonóides glicosilados, Kaempferol

ABSTRACT - Chemical prospection of compounds produced by *Senna alata* (L.) Roxb. with allelopathic activity: *Senna alata* (L.) Roxb. is a weed specie, frequent in pastures of the Amazonian region. Their leaves present medicinal properties. The study objective was the chemical prospection and the evaluation of the allelopathic activity of compounds presents in *S. alata* leaves. The plant material was dried, ground, submitted to exhaustive extraction with solution water/methanol (3:7). The crude extract obtained was then fractioned by wet chromatography column. The more pure fractions were submitted to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to determine their structures. To evaluate the effects of chemical substances isolated, were used concentrations of 50, 100, 150 and 200 ppm, in hydromethanolics solvents (3:7). The fractions were added in Petri dishes and their effects were evaluated on the seed germination and radicle and hypocotyl elongation of also two pastures weeds: *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*,

and *Senna alata* itself. The activity allelopathic compounds found in *S. alata* leaves belong to the flavonoids glycosides class, which aromatic core is a kaempferol and cause major inhibition on the the radicle elongation and on the germination of *S. obtusifolia* and *M. pudica*. About the autotoxic effects of this compound it is not very significant for the seedlings development and null on the germination.

Key words: Leguminosae, allelochemicals, NMR, flavonoids glycosides, kaempferol

INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como mata-pasto, *Senna alata* (L.) Roxb. é uma espécie daninha que infesta pastagens cultivadas da Região Amazônica, constituindo-se um problema de ordem bioeconômica a limitar o desempenho produtivo e a rentabilidade da atividade agrícola. É uma planta perene, arbustiva e, em observação do desenvolvimento em campo de indivíduos desta espécie, verificou-se que apresentam crescimento vegetativo extremamente rápido com tendência à formação de estandes puros. Esta característica pode ser uma evidência de dois fenômenos: alelospolia e alelopatia. A espécie é medianamente freqüente em áreas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, em quase todo o Brasil, principalmente em lugares úmidos (Lorenzi, 2000). *S. alata* pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, provavelmente nativa do Norte da América do Sul, foi naturalizada e cultivada desde os Estados Unidos da América até a Argentina (Irwin & Barneby, 1982).

As espécies de *Senna* eram incluídas em *Cassia sensu lato* até o tratamento taxonômico de Irwin & Barneby (1981), quando estes gêneros foram separados. Trabalhos recentes baseados em morfologia floral têm suportado esta divisão (Boonkerd et al., 2005). O gênero *Cassia sensu lato* possui um longo histórico de importância econômica, especialmente como plantas medicinais (Boonkerd et al., 2005).

A espécie *Senna alata* apresenta propriedades terapêuticas, na Índia, quase todas as partes da planta são utilizadas nos sistemas de medicina ayurvedica, unani e alopática (Damodaran & Venkataraman, 1994). Em muitos países, suas folhas, cascas, flores e raízes, podem ser utilizadas na medicina popular por suas propriedades antiherpética, antifebrífuga, antianêmica, antiblenorrágica, antinefrítica, antídota, antimicótica, diurética, parasiticida, laxante, e contra doenças de pele (Awal et al, 2004; Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Pieme et al., 2006; Plantamed, 2007). Na África, é plantada aos redores das casas para espantar formigas (Barrese Pérez et al., 2005). Ainda, o estudo de Agbagwa et al. (2003), demonstrou os efeitos alelopáticos do extrato

bruto de *S. alata*, que induziu um decréscimo consistente no percentual absoluto e na taxa de germinação, além de inibir o crescimento da radícula em *Celosia argentea*.

Na natureza existem milhares de compostos bioativos com propriedades inexploradas. Muitos destes são metabólitos secundários gerados por plantas como resultados de uma co-evolução, e que freqüentemente geram efeitos em outros organismos e, em muitos casos, possuem a função de compostos bioquímicos de defesa ou aleloquímicos. Desta maneira, numerosas plantas vêm sendo usadas, principalmente no meio rural como remédios, repelentes de insetos, venenos usados na pesca, entre outras finalidades (Chom & Kim, 2004; Souza-Filho, 2006).

Os relatos populares, ao lado de plantas conhecidas como tóxicas para o homem e animais, podem fornecer excelentes pistas para o estudo químico de produtos naturais, além de dados da literatura sobre ações antioxidantes, antiinflamatórias e inseticidas dos vegetais.

A química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Estes compostos podem ser de interesse acadêmico, não registrados na literatura especializada, intermediários de processos de biossíntese, ou de importância quimiotaxonômica, e algumas vezes, substâncias de interesse econômico, como novos agentes medicamentosos, ou novas fontes de compostos raros já utilizados (Matos, 1997). A prospecção permite ao químico o conhecimento preliminar do comportamento químico dos extratos com o qual se deverá trabalhar, e é instrumento utilizado na seleção de plantas para estudo. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a prospecção destas substâncias e o seu planejamento deve ser feito de acordo com objetivos específicos. Já a determinação da estrutura molecular dos constituintes isolados se constitui em um campo especializado da química orgânica e é feita principalmente pela interpretação de vários espectros obtidos em espectrômetros de absorção das radiações ultravioleta, visível e infravermelha, espectrômetro de ressonância magnética protônica e de carbono 13, espectrômetro de massas, entre outros (Matos, 1997).

O potencial para o uso de produtos naturais de plantas como herbicidas é grande. Seja para o uso direto ou como base para a síntese de novas moléculas herbicidas, uma vez que, embora o método de controle químico seja prático, possui uma série de limitações. O uso de herbicidas sintéticos, algumas vezes, leva à poluição ambiental além de causar efeitos inerentes, como resistência, entre outros. (Duke et al., 2000; Hachinohe & Matsumoto, 2007).

Entre os constituintes químicos até então identificados em *Senna alata* estão presentes taninos, triterpenos, esteróides, alcalóides, carboidratos redutores, flavonóides, saponinas, cumarinas, antocianidinas, emodina, antraquinona, chrysarabina, ribarina, ácido málico, ácido tartárico, ácido crisofânico e um óleo essencial (Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez *et al.*, 2005; Plantamed, 2007).

Objetivou-se neste estudo, o isolamento e a identificação de substâncias químicas encontradas em folhas da espécie *Senna alata*, bem como a caracterização de sua capacidade alelopática inibitória sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de espécies daninhas de áreas de pastagens cultivadas da região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e processamento de material vegetal:

A espécie *Senna alata* foi plantada em fevereiro de 2006, no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. A coleta foi realizada com as plantas na fase reprodutiva, em dezembro de 2006. As folhas colhidas foram secas em estufas, com circulação de ar forçada, à temperatura constante de 40 °C, durante 72 horas. Em seguida, o material foi triturado, em moinho tipo Willey.

Procedimentos de isolamento e identificação das substâncias químicas:

O material seco triturado (1 Kg) passou por processo de extração exaustiva com mistura de solvente água/metanol (3:7), por aproximadamente sete dias, com filtração e recolhimento periódicos do filtrado. Após esse período, o metanol foi eliminado a pressão reduzida, em rotavapor (BÜCHTEL131) à temperatura de 45 °C. Em seguida, a solução aquosa concentrada foi liofilizada, obtendo-se o extrato bruto hidrometanólico das folhas de *S. alata*.

Fracionou-se 10 g do extrato bruto hidrometanólico das folhas empregando-se coluna cromatográfica por via úmida (CCVU) com sílica-gel como adsorvente e três solventes (hexano, acetato de etila e metanol) e suas misturas de polaridades crescentes aplicadas sucessivamente (Figura 1).

Procedeu-se ao exame de pequenas amostras de cada fração obtida na etapa anterior, em cromatografia de camada delgada, CCD (ALUMINUM BACKED TLC, SILICA GEL, HARD LAYER, F-254, SAI), usando diversos sistemas de solventes. As cromatoplacas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda

de 254 nm em câmara escura. De acordo com as analogias e diferenças de composição, observadas pelas semelhanças das manchas nas cromatoplaças foram realizados refrações (Figura 1).

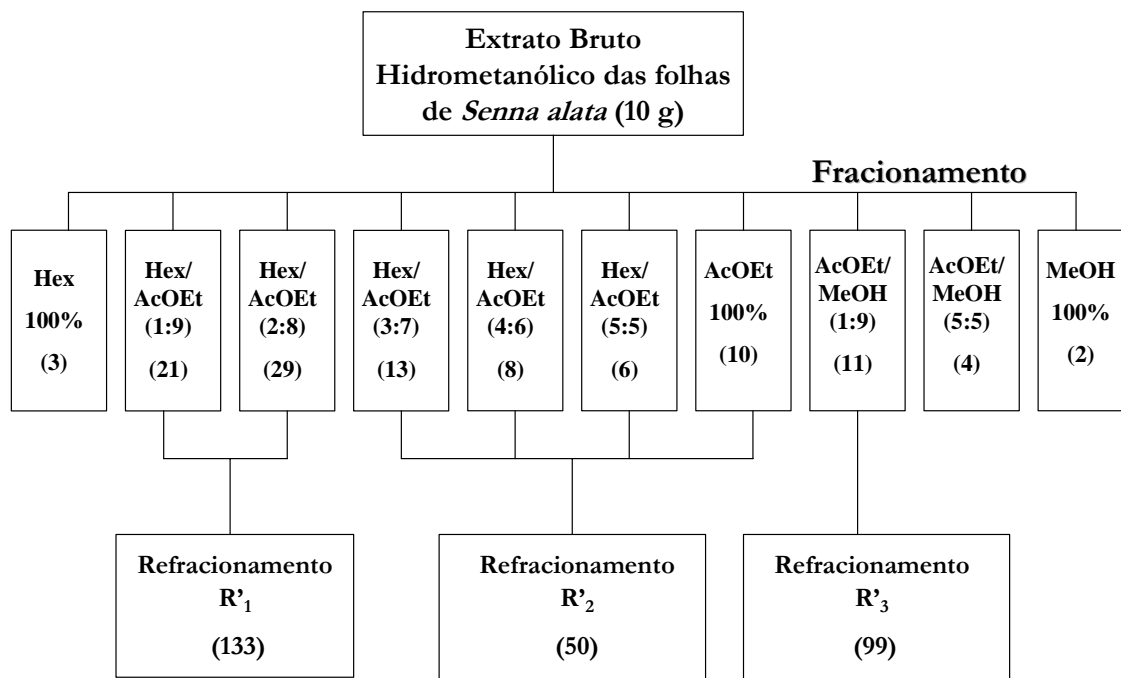


FIGURA 1: Esquema demonstrando os procedimentos de fracionamento e refrações partindo-se de 10 g do extrato bruto hidrometanólico de folhas de *Senna alata*. Entre parênteses a proporção dos solventes ou mistura destes utilizados e o número de frações coletadas em cada etapa.

Três refrações foram desenvolvidas, também via CCVU, com eluentes selecionados previamente de acordo com a CCD (Figura 1).

A Figura 2 representa o primeiro refração realizado a partir de 1,18 g provenientes da reunião das 50 frações coletadas após a passagem de sistemas de eluentes Hex/AcOEt (1:9) e (2:8) na primeira coluna. Foram obtidas 133 frações nesse refração.

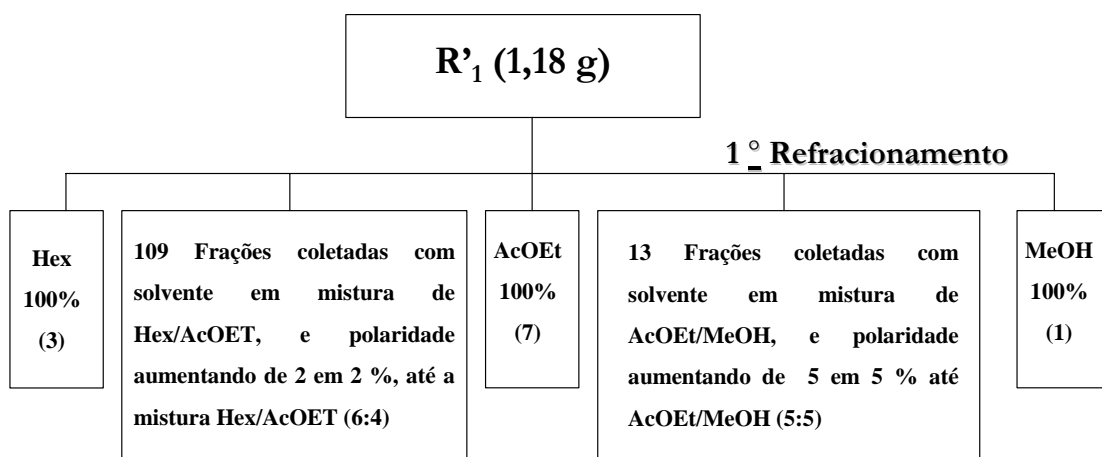


FIGURA 2: Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes, e o número de frações coletadas no primeiro refracionamento de reunião de frações coletadas da primeira coluna.

A Figura 3 representa o segundo refracionamento realizado a partir de 0,82 g provenientes da reunião das 37 frações coletadas após a passagem de sistemas de eluentes Hex/AcOEt (3:7), (4:6), (5:5) e AcOEt 100% na primeira coluna. Foram coletadas 50 frações.

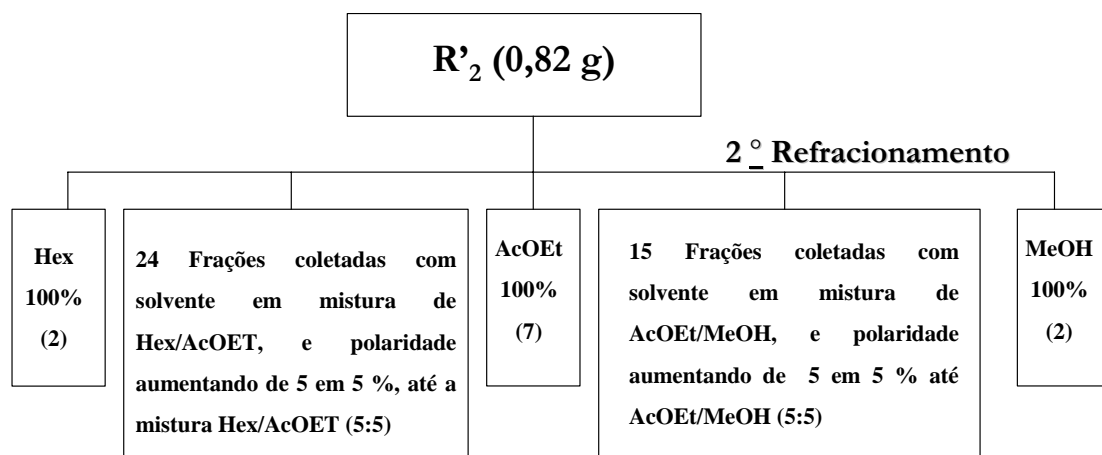


FIGURA 3: Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes, e o número de frações coletadas no segundo refracionamento de reunião de frações coletadas da primeira coluna.

A Figura 4 representa o terceiro refração realizado a partir de 2,02 g provenientes da reunião das 11 frações coletadas após a passagem do sistema de eluentes AcOEt/MeOH (1:9) na primeira coluna. Neste, foram coletadas 99 frações.

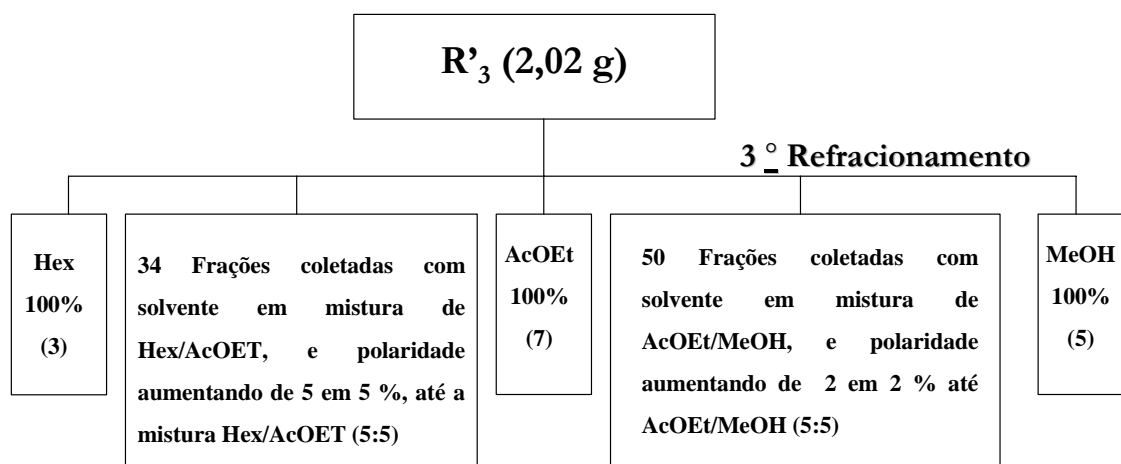


FIGURA 4: Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes, e o número de frações coletadas no terceiro refração de reunião de frações coletadas da primeira coluna.

As frações coletadas passaram novamente por exame em CCD, e aquelas que foram consideradas relativamente puras foram concentradas em capela de fluxo laminar (PACHANE), ou em rotavapor, pesadas e acondicionadas em pequenos frascos, e então encaminhadas ao laboratório de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear para a obtenção de espectros.

As reuniões de frações semelhantes foram submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H e de ¹³C), em Espectrofotômetro Modelo GEMINI 300-Varian, 75 MHz (RMN de ¹³C) e 300 MHz (RMN de ¹H), para a determinação das fórmulas estruturais das moléculas.

Foi realizado ainda um processo de derivatização como no procedimento realizado por Marín-Loaiza et al. (2008) de uma determinada fração, para injeção em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massa, (modelo GCMS-QP5050A, Shimadzu) em coluna DB5 (30 m x 0,25 µm x 0,25 µm). Neste processo 2,8 mg da fração foram dissolvidos em 60 µL de piridina e 100 µL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) a 70 °C por cerca de 30 minutos e posteriormente injetados diretamente em CG-MS.

Espécies receptoras utilizadas nos bioensaios:

As espécies receptoras selecionadas para os bioensaios de germinação e desenvolvimento foram:

- malícia, *Mimosa pudica* L.;
- mata-pasto liso, *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby;
- a espécie doadora *Senna alata*, no bioensaio de autotoxicidade.

Tais espécies são frequentes em áreas de pastagens cultivadas da região Norte (Borges et al., 2007). As sementes passaram por processo de limpeza e foram tratadas com ácido sulfúrico, em imersão, para quebra da dormência.

Bioensaios de germinação:

A germinação das espécies receptoras foi monitorada em períodos de 10 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (Juntilla, 1976; Duram & Tortosa, 1985). Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro foi forrada com uma folha de papel filtro qualitativo e recebeu 25 sementes de cada espécie receptora. Os bioensaios foram desenvolvidos em câmaras BOD Modelo 3740 (Forma Scientific, Inc. BOX 649 MARIETTA, OHIO 45750), em condições controladas de 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas.

Bioensaios de crescimento:

Os bioensaios de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foram realizados nas mesmas condições dos bioensaios de germinação, porém o fotoperíodo, neste caso, foi de 24 horas. Cada placa de Petri, forrada com papel de filtro qualitativo, recebeu três plântulas, de tamanhos uniformes, com aproximadamente três dias de germinação. Ao final do período de 10 dias de crescimento, o comprimento da radícula e do hipocótilo foram mensurados.

Outros procedimentos experimentais:

Para avaliação dos efeitos das substâncias químicas isoladas, utilizou-se as concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm, tendo como eluente solução hidrometanólica (3:7 v/v). O volume de solução das substâncias químicas testadas foi de 3,0 mL por placa de Petri. A solução-teste foi adicionada apenas uma vez, quando do início de cada bioensaio, sendo, a partir de então, adicionada apenas água destilada, sempre que preciso. Após a adição do extrato, deixou-se evaporar o solvente e adicionou-se 3,0 mL

de água destilada, mantendo-se dessa forma a concentração original. O tratamento-testemunha foi água destilada.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, com exceção à derivatização e injeção em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa, que foi realizado no Laboratório da Análise e Síntese de Agroquímicos, LASA, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Delineamento experimental e análise estatística:

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, em modelo tipo hierárquico com dois fatores. Os dados foram submetidos à análise da variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, e quando necessário foram submetidas à análise de regressão, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de germinação e alongamento do hipocótilo foram, ainda, transformados em \sqrt{x} para seguirem distribuição normal. As análises foram processadas, utilizando-se o programa SAEG (UFV, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Substâncias químicas isoladas das folhas de *Senna alata*

A Figura 5 apresenta, de forma sucinta, o fluxograma das diferentes fases desenvolvidas até o isolamento da substância testada. Partindo-se de 10 g do extrato bruto hidrometanólico foram coletadas 107 frações após o primeiro fracionamento. As frações com padrão cromatográfico semelhante, foram reunidas. Dentre as reuniões, foi denominada de R₃ a amostra obtida da junção das 11 frações coletadas na eluição com sistema Acetato de etila / Metanol (1:9), que totalizou 2,02 g de material seco. R₃ foi submetida a um refractionamento em CCVU resultando em 99 frações ao final. Todas elas foram novamente analisadas em cromatoplasmas, algumas reunidas e seguiu-se então à elucidação das estruturas moleculares destas substâncias ou classes de compostos por análise dos seus espectros de RMN de ¹H e de ¹³C. Da reunião das frações 1 e 2 coletadas na eluição do refractionamento de R₃ com sistema Acetato de etila / Metanol (3:97), obteve-se 327 mg de material seco, que foi chamada de C9.

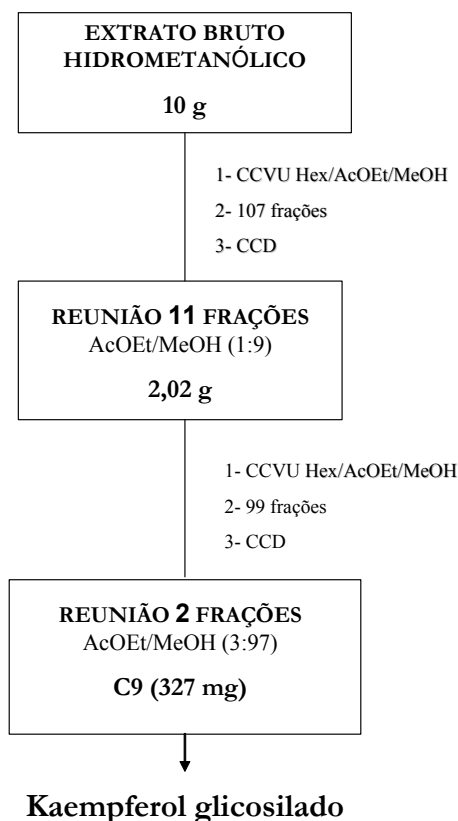


FIGURA 5: Fluxograma sucinto dos procedimentos de isolamento e identificação de substâncias químicas com atividade alelopática, presentes em folhas de *Senna alata*.

Comparando-se os resultados dos deslocamentos químicos dos carbonos (δ_C , Tabela 1) dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 da fração C9, com bibliografia sobre constituintes químicos encontrados em folhas de *S. alata* e com dados de RMN destes constituintes já publicados na literatura (Iwashina et al., 2000; Moriyama et al., 2003), detectou-se a presença de mistura contendo flavonóides glicosilados na amostra C9 (Figura 6, Tabela 1).

Alguns trabalhos reportaram a presença de kampferol-3-O-gentiobiosidío (Figura 6) em folhas de *Senna (Cassia) alata* (Moriyama et al., 2001). Na Indonésia, Moriyama et al. (2003), quantificou este metabólito nas diferentes partes da planta e em diferentes estágios de crescimento, demonstrando que as folhas maduras são as que apresentam o maior conteúdo deste produto, e ainda, que durante o período de outubro a dezembro há um decréscimo no conteúdo deste flavonóide em folhas juvenis.

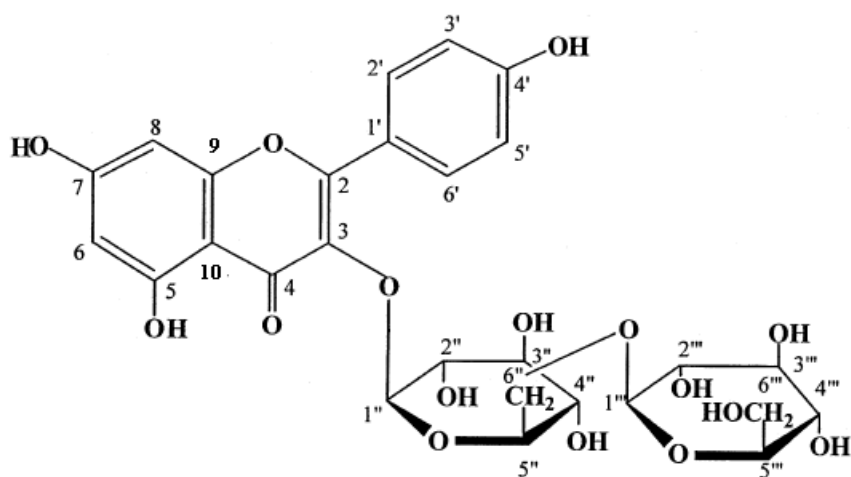


FIGURA 6: Estrutura do kaempferol-3-O-gentiobiosidío quantificados em folhas de *Senna alata* (Fonte: Moriyama et al., 2003).

O núcleo do flavonóide foi identificado como sendo um kaempferol por comparação de dados do RMN de Iwashina et al. (2000), como pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação de dados de deslocamentos químicos (δ_C) de RMN de carbono 13 da literatura (Iwashina et al., 2000) de kaempferol-3-O-gentiobiosidío e da fração C9 coletada neste estudo.

^{13}C	δ_C literatura	δ_C fração C9
2	157,6	158,4
3	135,1	132,2
4	178,5	179,4
5	162,6	163,0
6	99,8	99,9
7	166,0	165,9
8	94,6	94,7
9	158,0	159,0
10	105,2	104,7
1'	121,8	122,7
2',6'	132,0	132,2
3',5'	116,1	116,1
4'	161,6	161,5

Dentre os possíveis métodos de derivatização, a sililação, com recurso ao bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), permite a posterior identificação dos derivados trimetilsililados de alguns compostos. Durante a sililação, os hidrogênios das hidroxilas livres, dos compostos presentes na amostra, são substituídos por um trimetilsilil de massa igual a 73 (m/z 73). Portanto, as massas moleculares dos picos apresentados nos cromatogramas obtidos após essa derivatização, são adicionadas de tantas unidades de trimetilsilil quantos forem os números de hidroxilas livres presentes nas moléculas.

O composto kaempferol-3-O-gentiobioside apresenta massa molecular m/z 611 $[M + H]^+$ (Iwashina et al., 2000). Caso ocorra reação de hidrólise na ligação do glicosídeo ao núcleo flavônico (Figura 7), o flavonóide kaempferol livre irá apresentar massa m/z 285, podendo apresentar ligação de quatro unidades de trimetilsilil no lugar das hidroxilas livres (Figura 7), fornecendo massa m/z 575, após a sililação. Já o glicosídeo derivado da hidrólise apresenta massa m/z 325 e poderá apresentar sete unidades de trimetilsilil ligados à sua estrutura após a sililação, passando a apresentar massa m/z 836.

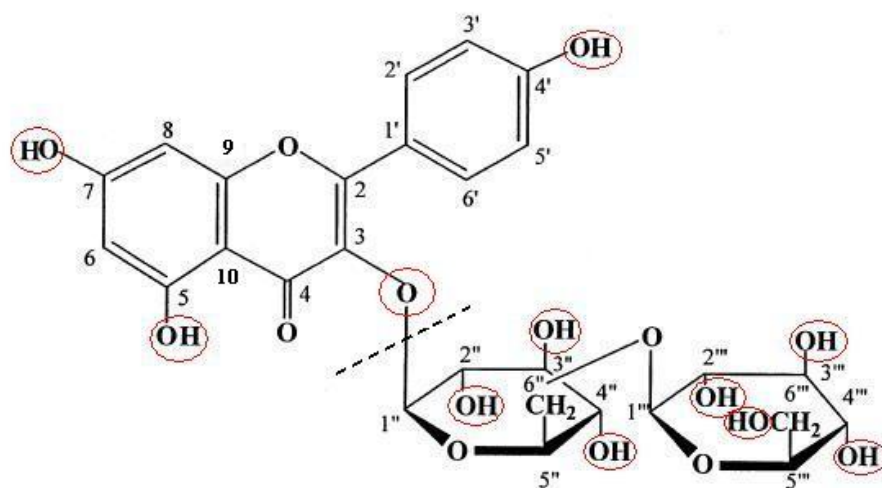


FIGURA 7: Hidrólise da ligação entre o glicosídeo e o kaempferol da estrutura de kaempferol-3-O-gentiobiosídeo (linha tracejada). Destacado em vermelho estão as hidroxilas onde é possível ocorrer a ligação de um trimetilsilil no lugar do Hidrogênio durante a sililação.

A fração C9 passou pelo processo de derivatização descrito e foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa fornecendo o seguinte cromatograma (Figura 8).

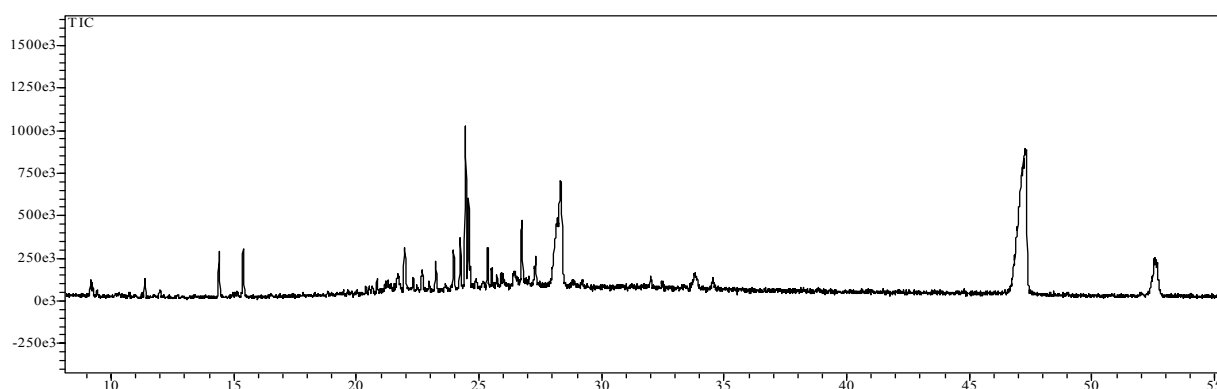


FIGURA 8: Cromatograma da fração C9.

Analisando-se os picos obtidos no cromatograma e a comparação dos espectros de massas fornecidos pela biblioteca de massas, os picos observados nos tempos de retenção de 28,25 min e 47,25 min apresentaram massas de 575 e 838 m/z . Portanto, a detecção destes picos no cromatograma indica a presença de um núcleo flavonóide kaempferol e gentiobiosídeo que poderiam estar ocorrendo livres na amostra ou podem ter sido derivados de uma hidrólise ocorrida durante os processos de extração da substância ou após a derivatização. Devido ao aspecto caramelizado da amostra C9 e a presença de muitos picos em seu cromatograma (Figura 8), conclui-se que esta amostra não está completamente purificada, dificultando a afirmação da ocorrência exata do composto kaempferol-3-O-gentiobiosídeo. O aspecto caramelizado da amostra é ainda, um indício de que ali estejam presentes muitos açúcares, compostos de polaridades muito altas que dificultam a separação dos flavonóides, esse fato é comum em amostras obtidas de plantas da família Leguminosae.

Outros estudos já identificaram flavonóides do tipo kaempferol glicosilados em Leguminosae-Caesalpinioideae. Como exemplo, o estudo realizado por Pizzolatti et al. (2003), que identificou 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilcanferol e 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosilcanferol em folhas de *Bauhinia forficata*.

A diversidade dos constituintes químicos das plantas, a ocorrência de pequenas quantidades de constituintes já conhecidos e muito comuns, ao lado de vários outros fatores interferentes, dificultam o trabalho de isolamento e purificação dos princípios imediatos desejados. Entre esses fatores estão as variações de composição devidas a

influências das mudanças climáticas e estacionais; a presença de compostos homólogos e isômeros; entre outros (Matos, 1997).

Os extratos brutos de plantas, quando se utilizam solventes polares, são muito complexos e ricos em diversos componentes, de modo geral, dificilmente separáveis. Sua análise cromatográfica direta, via de regra, torna-se extremamente trabalhosa, cuja separação é complicada pela presença de resinas e outros polímeros (Matos, 1997). Por este motivo, os fitoquímicos, em geral, preferem trabalhar com produtos naturais de baixa e média polaridade, já os biólogos e farmacologistas desejam preferencialmente os mais polares para realizarem bioensaios, inclusive porque tradicionalmente são considerados mais bioativos (Chaves et al., 2000).

Avaliação da atividade alelopática das frações isoladas das folhas de *S. alata*.

Os dados obtidos do bioensaio de germinação não seguiram uma distribuição normal, motivo pelo qual foram transformados em sua raiz quadrada. Como resultados, somente a interação entre os fatores foi não significativa indicando que cada fator (concentrações e espécies) agiu independentemente. Na figura 9, temos representados os resultados do teste Tukey e podemos observar que as espécies *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica* foram as mais afetadas não diferindo muito entre si, tendo sido inibidas até aproximadamente 55% da germinação de suas sementes na maior concentração de C9. Já os efeitos autotóxicos em *Senna alata* não foram expressivos durante a germinação.

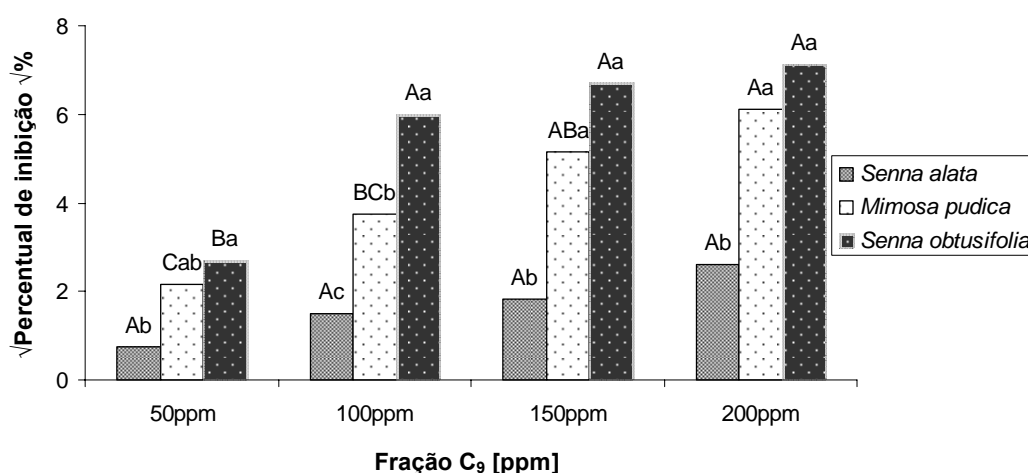


FIGURA 9: Efeito do extrato hidrometanólico da fração C9 obtida de *S. alata* sobre a germinação de diferentes espécies. Dados expressos em $\sqrt{\%}$. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada espécie e minúscula dentro de cada concentração não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os dados referentes ao crescimento da radícula não foram transformados, pois seguiram uma distribuição normal. Como resultados obtidos a interação entre os fatores foi significativa indicando uma dependência entre eles, ou seja, as concentrações de C9 influenciam no efeito sobre as espécies, e vice-versa. Na Figura 10, pode-se verificar que houve diferenças entre as espécies em todas as concentrações de C9.

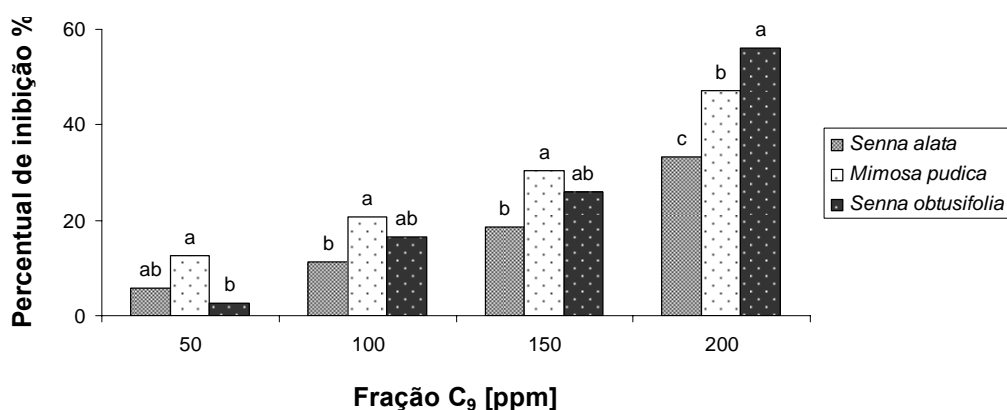


FIGURA 10: Efeito do extrato hidrometanólico da Fração C9 obtida de *S. alata* sobre o crescimento da radícula de diferentes espécies. Dados expressos em % de inibição em relação ao tratamento testemunha. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As espécies *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica* foram, novamente, as mais afetadas, com exceção da concentração mais baixa, com cerca de 55 e 45 % de inibição do alongamento da radícula, respectivamente, na maior concentração. Nas concentrações intermediárias de 100 e 150 ppm de C9, *M. pudica* foi mais afetada que *S. obtusifolia*, e esta, mais do que *Senna alata*, porém, a diferença foi sutil, entre 4 e 7%.

Na Figura 11, estão expostas as retas de regressão ajustadas e equações, mostrando o comportamento de cada espécie com o aumento da concentração da fração. Confirmando os resultados da Figura 10, todas as espécies sofreram inibição gradual no crescimento de suas radículas. A diferença mais acentuada foi indicada para *S. obtusifolia* com inibição da ordem de 2,6 % na menor concentração e 56 % na mais alta, passando da menos para a mais prejudicada, isso ressalta a importância de concentrações dos compostos maiores que 200 ppm para a melhor definição dos efeitos inibitórios sobre a radícula das espécies daninhas investigadas. E novamente, *S. alata* foi, em geral, a menos prejudicada.

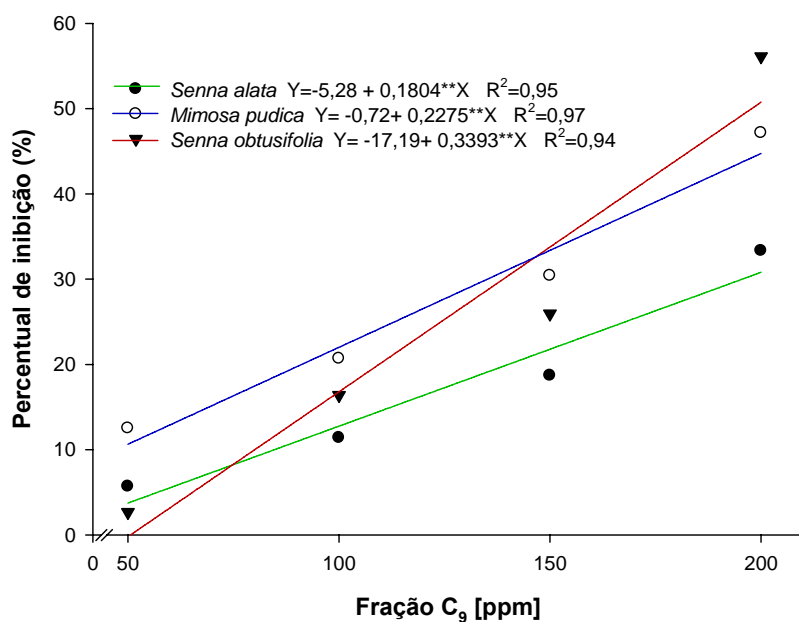


FIGURA 11: Efeito do extrato hidrometanólico da Fração C9 obtida de *S. alata* sobre o crescimento da radícula de diferentes espécies.

Os resultados sobre o alongamento do hipocótilo também sofreram transformação em sua raiz quadrada, à semelhança dos resultados da germinação. Não foi significativa a interação entre os fatores e os efeitos das diferentes espécies dentro de cada concentração da fração C9.

A fração 4, também coletada na eluição do refractionamento de R₃ com sistema Acetato de etila/Metanol (3:97), exibiu resultados dos deslocamentos químicos dos carbonos (δ_C) dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13, semelhantes ao da fração C9, porém em mistura mais intensa. O teste F realizado com os dados obtidos nos bioensaios de germinação e crescimento inicial não foram significativos à 5% de probabilidade, para esta fração.

Invasoras frequentemente estabelecem monoculturas virtuais onde comunidades diversas vicejavam, neste contexto, alelopatia tem sido sugerida como um dos mecanismos que dirigem a invasão destas plantas. Invasoras são definidas como aquelas espécies do subgrupo das espécies exóticas que exibem maior abundância, densidade, ou dominância competitiva em áreas onde foram introduzidas do que em suas regiões de origem. Algumas espécies invasoras podem ter um impacto alelopático mais forte sobre as outras espécies do local onde foram introduzidas, talvez devido ao fato de que em seus locais de origem as espécies, ao redor, estão mais bem adaptadas aos compostos bioquímicos inerentes (Inderjit et al., 2008).

Em estudos realizados por Simões et al. (2008), com *Sesbania virgata*, também uma leguminosa daninha tropical de crescimento rápido, utilizada em revegetação de florestas devastadas e reabilitação de áreas degradadas, foi observado que metabólitos liberados pelas sementes desta espécie inibiram o crescimento de *Arabidopsis thaliana* e arroz. O composto responsável por esse efeito alelopático parece ser o flavonóide (+)-catequina encontrado em alta quantidade no material liberado pelas sementes, no início da inibição. Os autores sugerem que o fato de suas sementes liberarem altas quantidades de (+)-catequina nos estágios iniciais de desenvolvimento pode representar uma vantagem adaptativa para suas plântulas que contribui para o seu comportamento invasivo e estabelecimento com sucesso em diferentes solos.

Flavonóides glicosilados, dentre outros 13 constituintes detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (electrospray ionization ESI-MS/MS), também parecem ter sido responsáveis pelos efeitos alelopáticos de extratos metanólicos de folhas de *Lonicera maackii* sobre *Arabidopsis thaliana* (Cipollini et al., 2008).

Em geral, ácidos fenólicos afetam em maior intensidade o crescimento inicial do que a germinação (Reigosa & Malvido, 2007), como demonstrado neste estudo

Podemos inferir, neste trabalho, que os compostos com atividade alelopática encontrados em folhas de *Senna alata* são substâncias de polaridade muito alta, pertencentes à classe dos flavonóides glicosilados, cujo núcleo aromático é um kaempferol, e que causam inibição intensa, primariamente, sobre o crescimento da radícula e sobre a germinação de *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica*. Já os efeitos autotóxicos deste composto são pouco expressivos quando se considera o crescimento da plântula e nulos sobre a germinação. Estes resultados corroboram com os encontrados nos testes preliminares realizados com todas as estruturas da planta, confirmando a potencialidade do kaempferol como aleloquímico.

LITERATURA CITADA

- AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F.A.; MENSAH, S.I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Applied Sci. Environ. Manag.**, v.7, n.1, p.9-13, 2003.
- AWAL, M. A.; NAHAR, A.; HOSSAIN, M. S.; BARI, M. A.; HAHMAN, M.; HAQUE, M. E. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. **J. Med. Sci.**, v.4, n.3, p.188-193, 2004.

- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E.; PULPEIRO, O. G. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 10, n. 2, p.1-5, 2005.
- BOONKERD, T.; PECHSRI, S.; BAUM, B. R. A phenetic study of *Cassia sensu lato* (Leguminosae-Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae) in Thailand. **Plant Syst. Evol.** v.252, p.153–165, 2005.
- BORGES, F.C., SANTOS, L.S., CORRÊA, M.J.C., OLIVEIRA, M.N.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p.51-59, 2007.
- CHAVES, M. H.; FREITAS, A.; ROQUE, N.F.; CAVALEIRO, A.J. Separação e identificação de constituintes químicos polares dos galhos de *Porcella macrocarpa*. **Quím. Nova**, v.23, n.2, 307-309, 2000.
- CHOM, S.U.; KIM, Y.M. Herbicidal potencial and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. **J. Agron. Crop Sci.**, v.190, p.145-150, 2004.
- CIPOLLINI, D.; STEVENSON, R.; ENRIGHT, S.; EYLES, A.; BONELLO, P. Phenolic Metabolites in Leaves of the Invasive Shrub, *Lonicera maackii*, and Their Potential Phytotoxic and Anti-Herbivore Effects. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 144–152, 2008.
- DAMODARAN, S.; VENKATARAMAN, S. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata*, Linn. Leaf extract against *Pityriasis versicolor*. **J. Ethnopharmacol.** v. 42, p.19-23,1994.
- DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v.19, p.583-589, 2000.
- DURAM, J.M.; TORTOSA, M.E. The effect of mechanical and chemical scarification of charlock (*Sinapsis arvensis*) seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.13, n.1, p.155-163, 1985.
- HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of Selective Phytotoxicity of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) in Barnyardgrass and Lettuce **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.1919–1926, 2007.
- INDERJIT; SEASTEDT, T. R.; CALLAWAY, R. M.; POLLOCK, J. L.; KAUR, J. Allelopathy and plant invasions: traditional, congeneric, and bio-geographical approaches. **Biol. Invasions**, DOI 10.1007/s10530-008-9239-9 Original Paper, 2008.

- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. Tribe Cassieae Bronn. In: R.M. Polhill; P. H. Raven (eds.). **Advances in legume systematics**. Part 1, Kew: The Royal Botanic Gardens, 1981. p. 97-106.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. The American Cassinae, a synoptical revision of Leguminosae, Tribe Cassieae, subtribe Cassinae in the New World. **Mem. New York Botanic Gard.**, v. 35, n.1-2, p.1-918, 1982.
- IWASHINA, T.; LOPEZ-SAEZ, J.H. A.; HERRERO, A.; KITAJIMA, J.; MATSUMOTO, S. Flavonol glycosides from *Asplenium foreziense* and its "ve related taxa and *A. incisum*. **Bioch. Syst. Ecol.**, v.28, p. 665-671, 2000.
- JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physiol. Plant.**, v.29, p.264-268, 1976.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 3 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 608p.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.
- MARÍN-LOAIZA, J. C.; ERNST, L.; BEUERLE, T.; THEURING, C.; CÉSPEDES, C. L.; HARTMANN, T. Pyrrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. **Phytochemistry**, v.69, p. 154–167, 2008.
- MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M. A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation **J. Pharm. Soc. Japan** v. 121, n.11, p. 817-820, 2001.
- MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MURATA, Y. HPLC quantification of kaempferol-3-O-gentiobioside in *Cassia alata*. **Fitoterapia** v. 74, p. 425–430, 2003.
- ORDOÑEZ, M. G.; GOVÍN, E. S.; BLANCO, M. de los A. G. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v.9, n.1, p.0-0, 2004.
- PIEME, C. A.; PENLAP, V.N.; NKEGOUM, B.; TAZIEBOU, C.L.; TEKWU, E.M.; ETOA, F. X.; NGONGANG, J. Evaluation af acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Caesalpiniaceae). **Afric. J. Biotechnol.**, v.5, n.3, p.283-289, 2006.
- PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides Glicosilados das Folhas e Flores de *Bauhinia forficata*. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p.466-469, 2003.

- PLANTAMED – **Plantas e Ervas Medicinais e Fitoterápicos** Disponível em:
<http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna_alata.htm> Acesso em:
30 abr. 2007.
- REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic Effects of 21 Plant Secondary Metabolites on *Arabidopsis thaliana* Germination and Root Growth. **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.1456–1466, 2007.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.
- SIMÕES, K.; DU, J.; KRETZSCHMAR, F. S.; BROECKLING, C. D.; STERMITZ, F. S.; VIVANCO, J. M.; BRAGA, M. R. Phytotoxic Catechin Leached by Seeds of the Tropical Weed *Sesbania virgata* **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p.681–687, 2008.
- SOUZA-FILHO, A.P.S. **Alelopatia e as Plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2006. 159p.

ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Senna alata* (L.) Roxb.

RESUMO: *Senna alata* é uma espécie daninha freqüente em pastagens da região Amazônica. Suas folhas apresentam propriedades medicinais. Indivíduos desta espécie foram cultivados e coletados no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, para a realização de análises anatômica e histoquímica das folhas, com a finalidade de fornecer elementos para a taxonomia, identificação microscópica de aleloquímicos e caracterização ecofisiológica da espécie. As folhas apresentaram duas formas de tricomas: tectores e glandulares. Outras características foliares encontradas para a espécie foram: lâmina foliar anfiestomática, mesofilo dorsiventral e epiderme abaxial papilosa. Algumas destas características sugerem um mecanismo de adaptação a ambientes com excesso de calor. As folhas ainda, são ricas em cristais de oxalato de cálcio, ao longo de suas nervuras, característica da subfamília Caesalpinioideae. Compostos fenólicos, tais como flavonóides e antraquinonas, foram encontrados em células epidérmicas, da base de tricomas e células dispersas no parênquima paliçádico, especialmente nas proximidades da nervura mediana. Este estudo confirma a presença de conhecidas classes de aleloquímicos em diferentes tipos de células do mesofilo de *Senna alata*.

Palavras-Chave: Aleloquímicos, Caesalpinioideae, Compostos Fenólicos

ABSTRACT - Anatomy and histochemistry of *Senna alata* (L.) Roxb. leaves: *Senna alata* is a weed specie, frequent in pastures of the Amazonian region. Their leaves present medicinal properties. Individuals of this specie were cultivated and collected in the Experimental Field of Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, to carry out anatomical and histochemical analyses of leaves, aiming to help taxonomy, microscopical identification of allelochemicals and ecophysilogic characterization of the specie. Leaves presented two forms of trichomes: tectors and glandulars. Others foliar characteristics of the specie were: amphiestomatic leaf, dorsiventral mesophyll and abaxial papilose epidermis. Some of these suggest an adaptation mechanism to excessive warm environments. Also, the leaves are rich in calcium oxalate crystals along their veins, a characteristic from Caesalpinioideae subfamily. Phenolic compounds, such as flavonoids and anthraquinones, were found in epidermal and basal trichomes cells, and scattered cells from palisade parenchyma, especially near the midvein. This study confirm the presence of known allelochemicals classes in different types of cells in *Senna alata* mesophyll.

Key Words: Allelochemicals, Caesalpinioideae, Phenolic Compounds

INTRODUÇÃO

Milhares de compostos bioativos com propriedades inexploradas existem na natureza. Muitos destes metabólitos secundários despertaram o interesse de cientistas, para estudar a sua estrutura, biossíntese e distribuição, mas não a sua função natural, até que alguns autores apontaram funções importantes destes compostos em plantas e ecossistemas. Quando não estão sendo utilizadas, estas substâncias são frequentemente estocadas em vacúolos e espaços intercelulares. Entretanto, podem ser liberadas para a defesa, atração ou como sinais químicos. Desde então, o papel da alelopatia nas funções fisiológicas, bioquímicas e ecológicas tem sido mais esclarecido. Muitos compostos voláteis, tais como terpenóides, são liberados das plantas em áreas secas (Chou, 1999). Em contraste, fitotoxinas hidrofílicas, tais como fenóis, flavonóides e alcalóides são liberados das plantas em áreas úmidas (Chou, 1999).

Na Região Amazônica, grande parte das áreas de pastagens cultivadas são infestadas por comunidade de plantas daninhas, sendo este um grande problema de ordem bioeconômica a limitar o desempenho produtivo. Conhecida popularmente como mata-pasto, *Senna alata* (L.) Roxb. é um bom exemplo de espécie prejudicial às pastagens da região. É uma planta perene, arbustiva, de crescimento rápido, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Nesta subfamília, *Senna* Mill. está entre os três maiores gêneros, com cerca de 250 espécies (Cronquist, 1981). A espécie é freqüente em áreas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, em quase todo o Brasil, principalmente em lugares úmidos (Lorenzi, 2000). Em inventário florístico realizado em vegetação secundária na região Bragantina, a leste de Belém do Pará, *Senna alata* foi encontrada entre os indivíduos de Leguminosae, família representada pelo maior número de espécies (Baar et al., 2004).

Possui propriedades terapêuticas, devendo ser ministrada com cautela, pois é suspeita de ser tóxica aos rins e é, ainda, considerada abortiva (Lorenzi, 2000). Já foi demonstrada, também, a atividade antibacteriana, antifúngica e antidermatofítica do extrato de *S. alata* (Ali-Emanuel et al., 2003; Awal et al., 2004; Ordoñez et al., 2004; Pieme et al., 2006). Entre seus componentes até então identificados, estão taninos, triterpenos, esteróides, alcalóides, carboidratos redutores, flavonóides, saponinas, cumarinas, antocianidinas, emodina, antraquinona, chrysarabina, ribarina, ácido málico, tartárico, crisofânico e óleo essencial (Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Plantamed, 2007).

O fato de uma determinada planta produzir uma dada substância química com função específica, não invalida a possibilidade dessa mesma planta servir como fonte química para outra finalidade. Muitos compostos com comprovadas propriedades medicinais foram investigados quanto aos seus efeitos alelopáticos (Souza-Filho, 2006). Além disso, espécies selvagens exibem maior probabilidade de síntese de metabólitos secundários, devido às pressões seletivas de ambientes adversos e da competição (Souza-Filho & Alves, 2002). O estudo realizado, anteriormente, por Agbagwa et al. (2003), demonstrou os efeitos alelopáticos do extrato bruto de folhas de *Senna alata*, que induziu um decréscimo consistente no percentual absoluto e na taxa de germinação, além de inibir o crescimento da radícula em *Celosia argentea*.

Os caracteres anatômicos dos órgãos vegetativos das plantas servem como dados adicionais às características morfológicas externas podendo ser usados para resolver problemas taxonômicos (Metcalf & Chalk, 1950). Em uma planta, a folha é o órgão vegetativo que apresenta maior variação estrutural, e as variações em seus caracteres estruturais têm sido interpretadas como adaptações a condições ambientais. Revela grande valor o exame das epidermes, não só pela forma e grandeza das suas células, mas particularmente pelos outros elementos ali encontrados de estruturas muito variadas, em particular os estômatos, pêlos e glândulas externas (Costa, 1975).

São escassos os estudos de morfologia e anatomia de espécies de Leguminosae, como as descrições apresentadas por Solereder (1908) e Metcalf & Chalk (1950), que apresentam características anatômicas de relevância taxonômica nas principais famílias das dicotiledôneas. Lersten & Curtis (1993, 1994, 1996) realizaram estudos de anatomia foliar de 106 espécies representativas de todos os 47 gêneros da tribo Caesalpineae. Pelo levantamento bibliográfico, foi possível constatar que, embora caracteres anatômicos da família Leguminosae, Caesalpinioideae, tenham sido estudados por alguns outros autores (Carvalho, 1983-1985; Lester & Curtis, 1996; Francino et al. 2006; Moreira-Coneglian & Oliveira, 2006; De- Paula & Oliveira, 2007), as espécies do gênero *Senna* carecem de estudos anatômicos e histoquímicos.

Pesquisas em alelopatia representam um campo novo da ciência, que deve ser contínua e expandida por todas as áreas. Dada a grande importância de *Senna alata* principalmente para a região Norte do Brasil, devido à preferência por lugares úmidos, este trabalho foi realizado com a finalidade de identificação da espécie em estágio vegetativo através do estudo anatômico de suas folhas, e obtenção de elementos para a identificação microscópica de aleloquímicos produzidos e/ou estocados nesse órgão vegetal. Uma vez que esse tipo de estudo é raro na área de alelopatia, os resultados dos

testes histoquímicos servirão como elemento de localização e identificação da natureza química de aleloquímicos nas células do mesofilo e para a prospecção dos princípios ativos. Além disso, seus dados anatômicos podem auxiliar na caracterização ecofisiológica da espécie, servindo de apoio para a melhor definição da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

Senna alata foi plantada no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. O plantio ocorreu em fevereiro de 2006. Uma amostra da espécie, identificada por botânicos da mesma instituição foi depositada no herbário sob registro IAN 183561. Em março de 2008, foram coletadas, aleatoriamente, folhas completamente expandidas de 10 indivíduos adultos escolhidos ao acaso. Foram coletados folíolos da base, meio e ápice destas folhas.



FIGURA 1: *Senna alata* no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, em diferentes fases de desenvolvimento.

Microscopia de luz

Os folíolos foram divididos em três regiões: apical, mediana e basal, fixadas em FAA₅₀ e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, foram retirados das amostras fragmentos de aproximadamente 25 mm² da região da nervura central e margem dos folíolos. Os fragmentos foram desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica) seguindo a técnica usual em anatomia vegetal (Johansen, 1940).

Com o auxílio de micrótomo rotativo da marca Leica RM2145, foram confeccionadas as lâminas permanentes. A montagem foi feita em Entelan (Johansen, 1940). Foram realizados, ainda, cortes paradérmicos à mão livre, submersos por algumas horas em hipoclorito de sódio comercial. O material foi corado em seguida com azul de toluidina pH 4, verde malaquita e astrablau (Braga, 1977).

As fotomicrografias foram obtidas com câmera digital acoplada em fotomicroscópio Axioskop MC80, Carl Zeiss.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Fragmentos de aproximadamente 25 mm² de folíolos do material em análise foram submetidos ao processo de desidratação em série etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), por um período total de duas horas e 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram secas ao ponto crítico, que consiste na substituição do etanol por CO₂ líquido (Bozzola & Russel, 1991) e metalizadas com pó de ouro a fim de que fossem depositadas, devidamente organizadas, em suportes circulares de metal (“stubs”), para a obtenção de fotos em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JMS-5400 LV, JEOL, do Laboratório de Geologia do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará.

Histoquímica

Para a confecção de lâminas semi-permanentes, foram utilizados cortes à mão livre de folhas frescas (região da nervura mediana) feitos com lâminas de aço, com a finalidade de realizar testes histoquímicos.

Os testes aplicados e as respectivas classes de metabólitos avaliadas encontram-se resumidos na Tabela 1. Testes histoquímicos foram realizados para identificação de alcalóides, lipídios e compostos fenólicos. A natureza química dos cristais foi analisada pela sua solubilidade em ácido clorídrico.

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados para a detecção das principais classes de aleloquímicos em folhas de *Senna alata*

Grupos metabólicos		Reagentes
Lipídios	Lipídios totais	Sudan III, Sudan Black (Johansen, 1940; Jensen, 1962)
Compostos fenólicos	Compostos fenólicos gerais	Dicromato de potássio (Gabe, 1968)
		Cloreto de férrico (Johansen, 1940; Costa, 1975)
		Hidróxido de sódio (Costa, 1975)
	Taninos	Sulfato ferroso (Johansen, 1940)
Alcalóides		Reagente de Dragendorff (Costa, 1975)
Cristais de oxalato de cálcio		Ácido Clorídrico (Chamberlain, 1932)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Folíolos

As características das folhas e folíolos citadas para a espécie *Senna alata* em levantamento realizado por Rodrigues et al. (2005), foram confirmadas neste trabalho. As folhas apresentam de 7 a 13 pares de folíolos, glândulas são ausentes, os folíolos obovados ou oblongos, ápice arredondado, obtuso ou retuso, base oblíqua, face adaxial glabrescente e abaxial puberulenta.

Os folíolos são anfiestomáticos. O tipo de estômato predominante é o paracítico (Figuras 2A e 2C), com ocorrência de estômatos anisocíticos. Tricomas tectores (Figuras 2, 3 e 4) foram observados sobre ambas as faces da lâmina foliolar. Os tricomas tectores são unisseriados (Figuras 3A, 3E-F), longos com granulação de cera em sua superfície (Figura 3C), mais adensados sob a nervura mediana (Figuras 2D e 2E) na face abaxial. A face adaxial apresenta pêlos tectores esparsos (Figura 3F). Foram encontrados pêlos glandulares unicelulares esparsos com base espessa, na forma de balão ou clava e geralmente em sulcos (Figura 4C) sobre a nervura mediana na face abaxial (Figuras 4, 5A-C). Alguns deles apresentavam-se flácidos e enrugados, provavelmente por terem liberado seu conteúdo e outros rompidos (Figuras 4B, 5A-C).

Solreder (1908), Metcalfe & Chalk (1950) e Watson (1981) comentam que o tipo mais comum de estômato na subfamília Caesalpinioideae, é o paracítico, além de citar que muitos gêneros, em especial *Cassia* (*Senna*), apresentam folhas com estômatos

usualmente confinados à superfície inferior, mas algumas vezes descrita também na superior em certas espécies de *Cassia* (*Senna*), como foi observado no presente estudo. Segundo Costa (1975) em geral, o indumento de pêlos atinge maior desenvolvimento na face abaxial.

Senna alata é considerada uma planta que apresenta altas taxas de fotossíntese e de condutância estomática ao nível foliar (Marabesi, 2007). Folhas anfiestomáticas são comuns em plantas com alta capacidade fotossintética podendo indicar que essa é uma característica adaptativa em *Senna alata* devido à seleção competitiva e das adversidades do meio (Fahn, 1990). Neste sentido, também, a presença de tricomas pode ser interpretada como proteção de estômatos e até mesmo do mesófilo contra o excesso de calor e ainda no isolamento e reflexão da luz (Monteiro et al., 1985). Segundo Metcalfe & Chalk (1950) pêlos não glandulares unicelulares de vários tamanhos e tipos são encontrados para o gênero *Cassia* (*Senna*), em *Cassia armata* constituiu-se fino e longo, superficialmente granuloso, e curvado em *C. obtusa*. Metcalfe & Chalk (1950) citam também, a presença de tricomas glandulares hirsutos com base esférica em certas espécies de *Cassia* (*Senna*), ou largo em forma de clava, visível a olho nu, ocorrendo na margem de folhas de *C. occidentalis*.

Epiderme

A epiderme é unisseriada em ambas as faces dos folíolos, papilosa na face abaxial (Figuras 2D-F, 3A-D), não papilosa ou sub-papilosa na face adaxial (Figuras 2A-B e 3F). As células epidérmicas apresentam ainda, em sua superfície, deposição de cera em forma de pequenas placas (Figuras 3B-D). Em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas são sinuosas (Figura 5E). As células da base dos tricomas são dispostas radialmente (Figuras 2D-F, 3A-C).

Metcalfe & Chalk (1950) assinalam a ocorrência de epiderme papilosa e sub-papilosa em algumas espécies de *Cassia* (*Senna*). Funções similares à dos tricomas têm sido atribuídas à epiderme papilosa, como proteção aos estômatos ou incremento da reflexão dos raios solares (Monteiro et al., 1985).

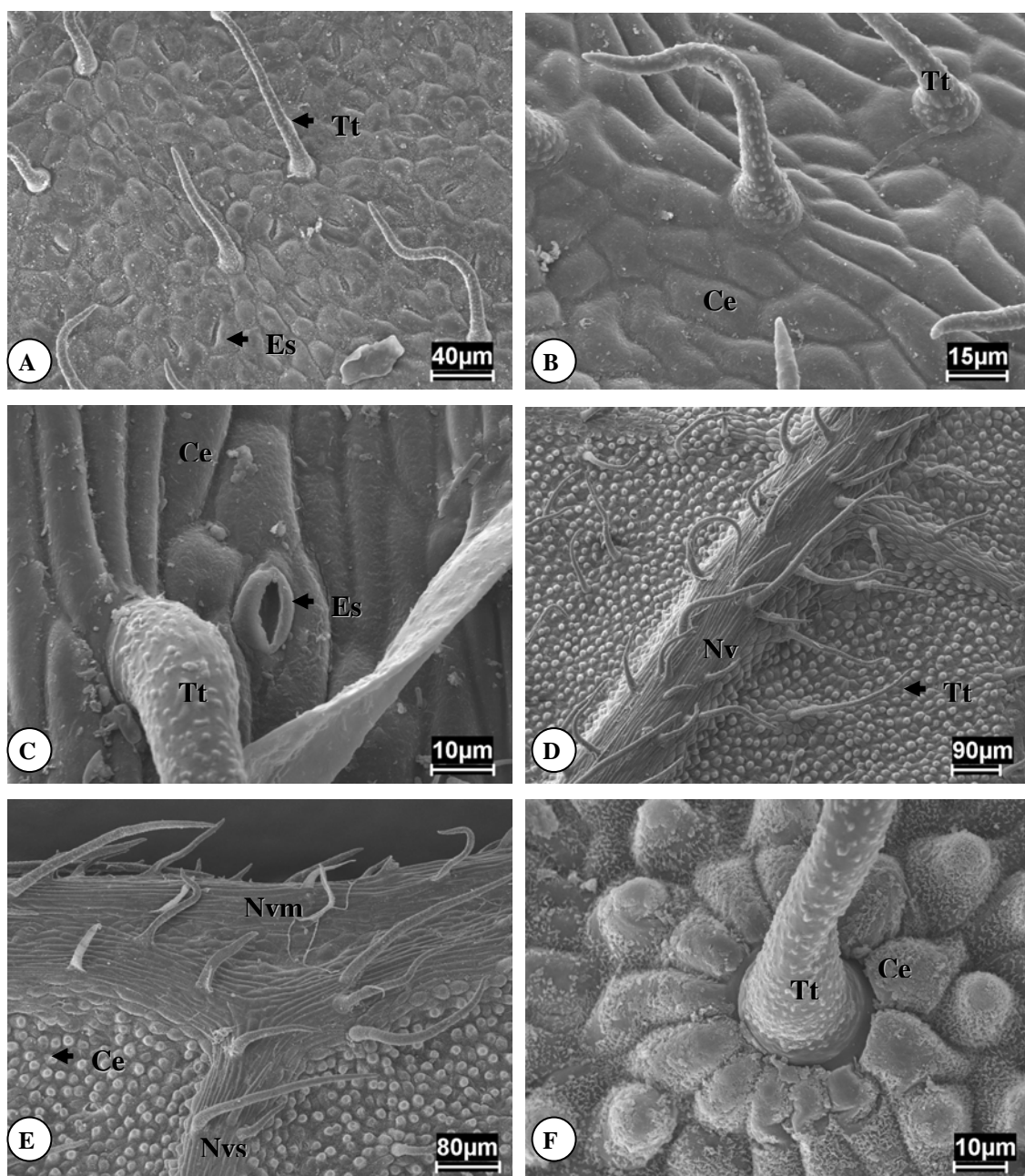


FIGURA 2: Epidermes de *Senna alata* em microscopia eletrônica de varredura. **A.** face adaxial com tricomas e estômatos, **B.** epiderme da face adaxial, **C.** nervura mediana, face abaxial com tricoma e estômato, **D** e **E.** face abaxial epiderme papilosa e tricomas sobre nervuras; **F.** células epidérmicas dispostas radialmente na base do tricoma, face abaxial. **Abreviaturas** – **Ce:** células epidérmicas, **Es:** estômato, **Nv:** nervura, **Nvm:** nervura mediana, **Nvs:** nervura secundária, **Tt:** tricoma tector.

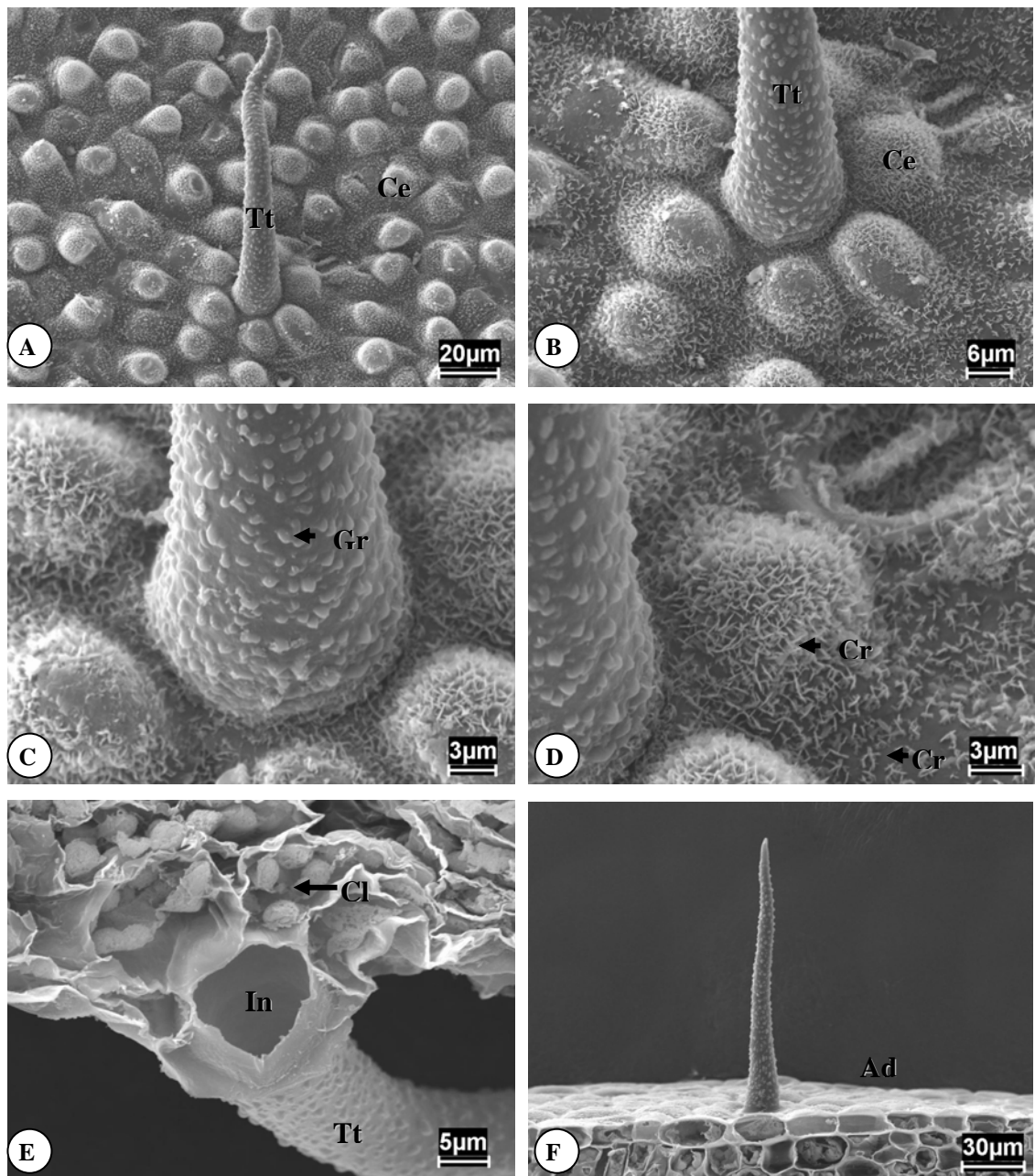


FIGURA 3: Epidermes de *Senna alata* em microscopia eletrônica de varredura. **A e B.** face abaxial com tricomas e epiderme papilosa, **C.** tricoma tector com granulações de cera em sua superfície, **D.** Deposições de cera em forma de placa sobre a epiderme abaxial. **E.** detalhe de um corte transversal mostrando tricoma tector unisseriado aberto na face abaxial e células subepidérmicas com cloroplastos, **F.** detalhe de um corte transversal mostrando células epidérmicas e subepidérmicas da face adaxial. **Abreviaturas** – **Ad:** face adaxial, **Ce:** células epidérmicas, **Cl:** cloroplastos, **Cr:** cera, **Gr:** granulações, **In:** interior, **Tt:** tricoma tector.

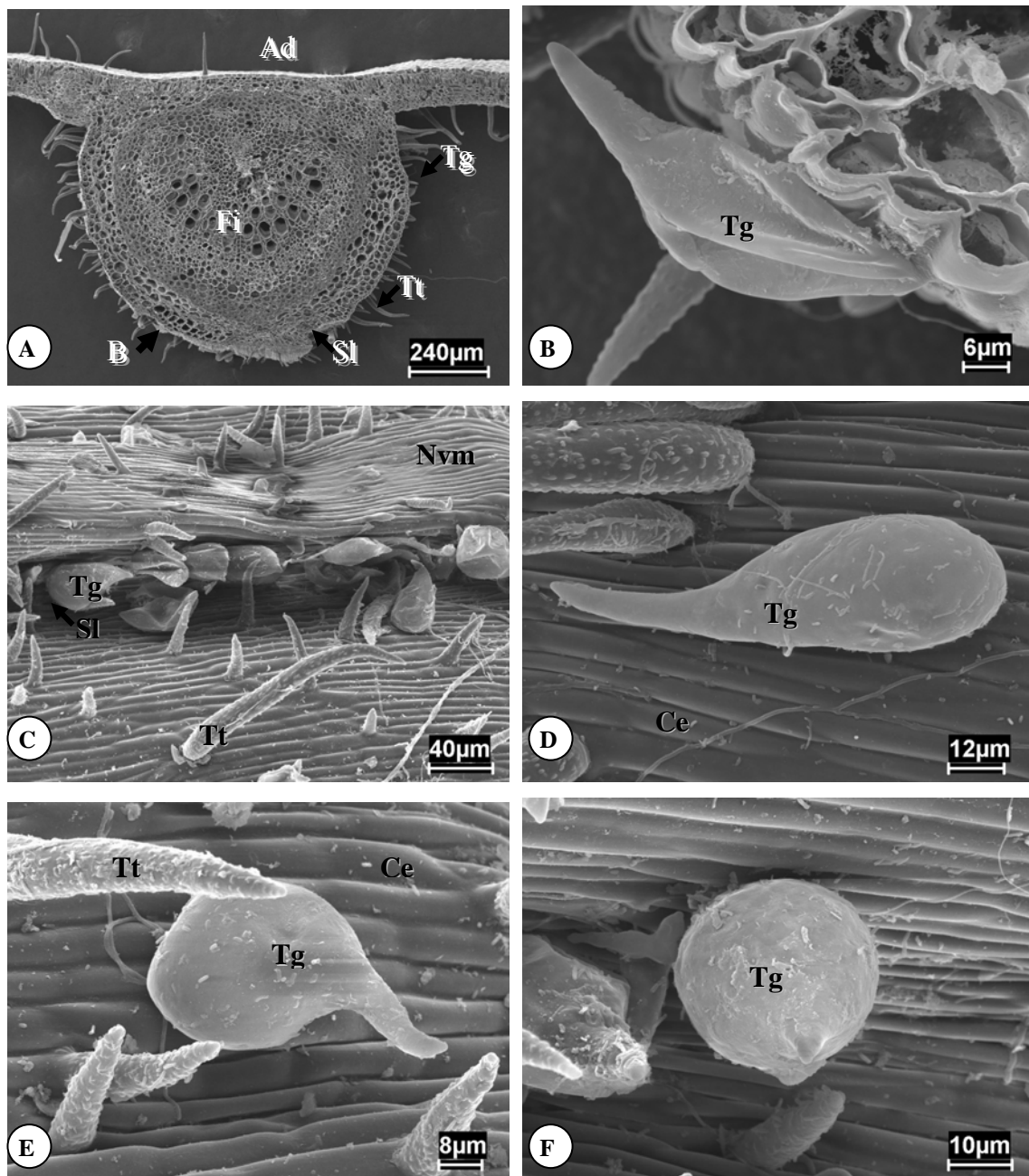


FIGURA 4: Folhas de *Senna alata* em microscopia eletrônica de varredura. **A.** corte transversal na região da nervura mediana, **B.** detalhe do corte transversal A, mostrando tricoma glandular sobre nervura mediana, face abaxial, **C.** tricomas glandulares dispostos em sulco sobre a nervura mediana, face abaxial, **D, E e F.** tricomas glandulares sobre epiderme da nervura mediana, face abaxial. **Abreviaturas** – **Ad:** face adaxial, **Ce:** células epidérmicas, **Fi:** fibras, **Sl:** sulco, **Nvm:** nervura mediana, **Tg:** tricoma glandular, **Tt:** tricoma tector.

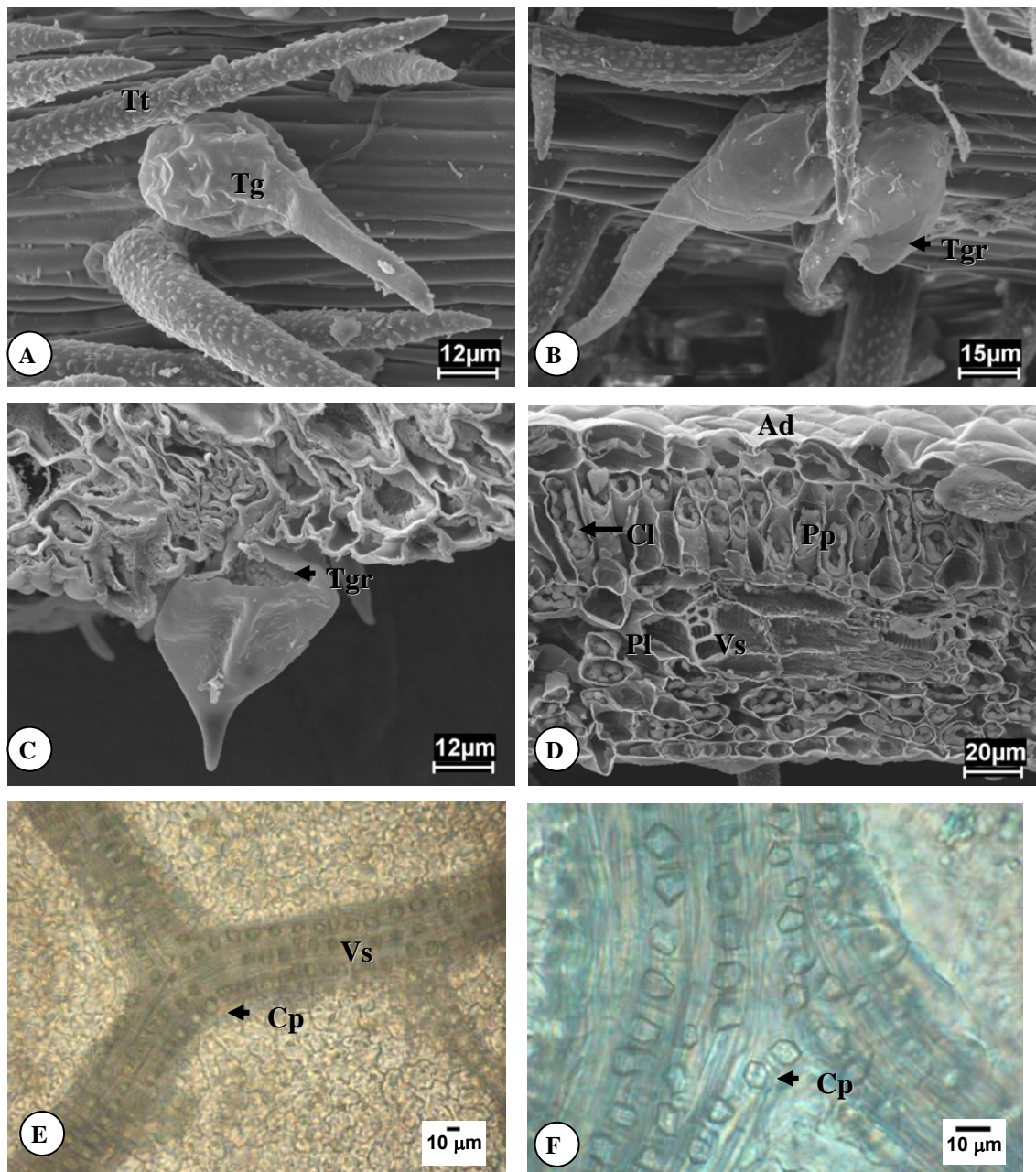


FIGURA 5: Folhas de *Senna alata* em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. **A.** tricoma glandular flácido sobre epiderme da nervura mediana, face abaxial, **B.** tricoma glandular rompido sobre epiderme da nervura mediana, face abaxial, **C.** tricoma glandular rompido sobre epiderme da face abaxial, **D.** detalhe de um corte transversal de mesofilo, **E** e **F.** vista frontal do limbo foliar em corte paradérmico, feixes vasculares apresentando cristais prismáticos agrupados, **Abreviaturas** – **Ad:** face adaxial, **Cl:** cloroplastos, **Cp:** cristais prismáticos, **Fi:** fibras, **Pl:** parênquima lacunoso, **Pp:** parênquima paliçádico, **Tg:** tricoma glandular, **Tgr:** tricoma glandular rompido, **Tt:** tricoma tector, **Vs:** Feixes vasculares.

Mesofilo

Secções transversais da lâmina foliar revelam mesofilo com organização dorsiventral (Figuras 4A e 5D), o que são geralmente encontrados no gênero *Cassia* (*Senna*) por Metcalfe & Chalk (1950). O parênquima paliçádico é voltado para a face adaxial do folíolo e apresenta predominantemente um estrato de células curtas podendo, às vezes, apresentar dois estratos (Figura 5D). O parênquima lacunoso apresenta-se compacto, devido ao tamanho pouco desenvolvido das lacunas, suas células têm formas variadas e pouco ramificadas.

Diferentemente dos resultados obtidos para *Senna alata*, Costa (1975) cita que as folhas do sene (*S. angustifolia*) não possuem dorsiventralidade e apresentam um tipo de mesofilo cêntrico heterogêneo, com tecido lacunoso entre as camadas de paliçada.

Vascularização

Os feixes são do tipo colateral, fibras ocorrem associadas aos feixes (Figura 4A), mas a natureza dessas fibras deve ser posteriormente analisada. Metcalfe & Chalk (1950) comentam que feixes vasculares das nervuras são usualmente acompanhados por esclerênquima enterrados no mesofilo em espécies de *Cassia* (*Senna*).

As células epidérmicas, na região da nervura, são alongadas (Figuras 2C-E, 4C-F, 5A-B). Foram observados, na face abaxial ao longo da nervura mediana, sulcos onde se adensavam tricomas glandulares (Figura 4C). A nervura mediana é proeminente na face abaxial (Figuras 2D-E e 4A). O mesofilo, nas proximidades da nervura mediana, não apresenta suas células diferenciadas em paliçádico e lacunoso (Figura 4A), na face adaxial e na face abaxial têm-se parênquima propriamente dito.

Foram encontrados cristais prismáticos de oxalato de cálcio acompanhando as nervuras foliares (Figuras 5E-F). Metcalfe & Chalk (1950) mencionam que a presença de grupos de cristais, especialmente no mesofilo, é um caráter utilizado para a diferenciação entre as subfamílias de Leguminosae. No estudo anatômico foliar de *Cassia ensiformes*, também foi evidenciada a presença destes cristais (Carvalho, 1983-1985).

Histoquímica

A reação para detecção de lipídios totais evidenciou a presença destes compostos na cutícula e nas paredes espessas das fibras associadas aos feixes (Tabela 2).

Após a reação com hidróxido de sódio, foram observadas nos cortes transversais, algumas células epidérmicas na face abaxial, na região da nervura mediana

coradas de castanho-avermelhado. Também se coraram algumas células dispersas pelo mesofilo, com maior concentração nas proximidades das nervuras, na altura de ambas as epidermes e, algumas vezes, associadas às células da base dos tricomas (Tabela 2). Imediatamente após o contato dos cortes com a solução de hidróxido de sódio, observou-se que as células da região da nervura mediana coraram-se de castanho-avermelhado. O hidróxido de sódio a 5%, segundo Costa (1975), já referido como agente esclarecedor na montagem das preparações microscópicas, é também um reagente cromático: com os compostos antraquinônicos coram-se de vermelho; dissolve a hesperidina e coram-se de amarelo; com os taninos e alguns outros compostos fenólicos origina cor castanha, que escurece com o passar do tempo.

Tabela 2: Resultados dos testes histoquímicos realizados

Grupos metabólicos		Resultado	Local encontrado
Lipídios	Lipídios totais	+	Cutícula e paredes espessas de fibras associadas aos feixes
Compostos fenólicos	Compostos fenólicos gerais	+	Células epidérmicas, células dispersas no mesofilo, parênquima paliçádico e células da base de tricomas, na região da nervura mediana.
	Taninos	-	-
Alcalóides		-	-
Cristais de oxalato de cálcio		+	Ao longo das nervuras

+ (presença); -(ausência)

Algumas células da base de tricomas, na região da nervura mediana, e células do parênquima paliçádico coraram-se de castanho após a reação com cloreto férrico (Tabela 2). Segundo Costa (1975), solução aquosa de cloreto férrico a 1% em contato com taninos produz colorações verde-enebrecidas (outros compostos com hidróxidos fenólicos produzem também colorações).

À semelhança da reação ocorrida com hidróxido de sódio e cloreto férrico, após reação com dicromato de potássio, células do parênquima paliçádico e da epiderme abaxial na região da nervura mediana coraram-se de castanho (Tabela 2).

Para o reconhecimento dos metabólitos nas células utilizam-se, habitualmente, reagentes corantes, alguns específicos outros mais gerais. Assim, algumas vezes

recomenda-se o emprego simultâneo de mais de uma reação cromática (Costa, 1975). Devido à presença de compostos fenólicos pertencentes a classes distintas, nas folhas de *Senna alata*, foram realizados três testes histoquímicos diferentes para a detecção destes compostos.

As reações para a detecção de taninos e alcalóides não revelaram a presença destes compostos (Tabela 2) no material analisado.

O gênero *Senna* é pródigo como fonte de compostos de natureza antraquinônica com diversas propriedades biológicas e farmacológicas (Alemayehu et al., 1998). Em testes fitoquímicos anteriores realizados com indivíduos de *Senna alata* provenientes do mesmo local de coleta deste trabalho, foram identificadas, em suas folhas, as classes químicas: ácidos graxos, alcalóides, e compostos fenólicos como antraquinonas, cumarinas, flavonóides, saponinas e taninos (Rodrigues et al., prelo). Desta forma, os testes histoquímicos selecionados para a realização do presente trabalho foram referentes a tais classes.

Os flavonóides de acordo com Costa (1975) encontram-se localizados, habitualmente, nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, nas camadas em paliçada, nos parênquimas esponjosos, dissolvidos no suco celular sob a forma de heterosídeos; quando o conteúdo atinge um valor elevado aparecem sob a forma de cristais ou de massas coradas de amarelo. Solubilizam-se nos hidróxidos alcalinos e resultam soluções mais intensamente coradas de amarelo-alaranjado ou escurecido.

Já os compostos antraquinônicos encontram-se dissolvidos no citoplasma das células parenquimatosas e conferem a estas a sua cor amarela ou avermelhada característica (Costa, 1975). De fato, na face abaxial das folhas mais maduras de *Senna alata*, são observadas, a olho nu, algumas manchas avermelhadas sob a nervura mediana.

Metcalfé & Chalk (1950) assinalam a presença de pêlos glandulares, células secretoras de vários tipos e até nectários em Caesalpinioideae e com variados conteúdos, mas de acordo com Solereder (1908) os idiobalstos taniníferos, comuns nas Papilionoideae, são raros em Caesalpinioideae.

Os sistemas de defesa das plantas são considerados complexos, e nos representantes das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae (Leguminosae), estão, algumas vezes, relacionados à produção de taninos e terpenóides, além de interações simbióticas com formigas, por exemplo (Polhill et al., 1981). Na África, *Senna alata* é plantada ao redor das casas para espantar formigas (Barrese Pérez et al., 2005).

As folhas apresentaram duas formas de tricomas: tectores e glandulares. Também foram descritas outras características foliares para a espécie como lâmina foliar anfiestomática, mesofilo dorsiventral, epiderme abaxial papilosa, deposição de cera sobre as células epidérmicas. Algumas destas características sugerem um mecanismo de adaptação a ambientes com excesso de calor, favorecendo a reflexão da luz e proteção dos estômatos. As folhas ainda, são ricas em cristais de oxalato de cálcio ao longo de suas nervuras, característica da subfamília Caesalpinioideae, assim como estômatos predominantemente paracíticos. Compostos fenólicos, tais como flavonóides e antraquinonas, foram encontrados em células epidérmicas, da base de tricomas e células dispersas no parênquima paliçádico, especialmente nas proximidades da nervura mediana.

Este estudo fornece características anatômicas foliares específicas de *Senna alata* que, juntamente de outros caracteres mais gerais, permitem sua identificação através da análise microscópica desta estrutura. A presença de tricomas glandulares em forma de clava, ao longo de sulcos sobre a nervura mediana de seus folíolos, e tricomas tectores longos, adensados na face abaxial, com granulações de cera em sua superfície são algumas das características específicas. Além disso, confirmou a presença de conhecidas classes de aleloquímicos em diferentes tipos de células do mesofilo de *S. alata*. As colorações foram discretas e efêmeras nos testes histoquímicos, desta forma, não podemos inferir com exatidão a origem de biossíntese dos compostos encontrados para a indicação na prospecção destes, devendo ser realizados mais testes para esta conclusão, especialmente com as células dos tricomas glandulares.

LITERATURA CITADA

- AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F.A.; MENSAH, S.I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Applied Sci. Environ. Manag.**, v.7, n.1, p.9-13, 2003.
- ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B.; KRAUS W.A. 1-4, anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. **Phytochemistry**, v.48, n.4, p.699-702, 1998.
- ALI-EMANUEL, N.; MOUDACHIROU, M.; AKAKPO, J. A.; QUETIN-LECLERCQ. Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 86, p.167-171, 2003.

- AWAL, M. A.; NAHAR, A.; HOSSAIN, M. S.; BARI, M. A.; HAHMAN, M.; HAQUE, M. E. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. **J. Med. Sci.**, v.4, n.3, p.188-193, 2004.
- BAAR, R.; CORDEIRO, M. dos R.; DENICH, M.; FOLSTER, H. Floristic inventory of secondary vegetation in agricultural systems of East-Amazonia. **Biod. Conserv.**, v. 13, p. 501–528, 2004.
- BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E.; PULPEIRO, O. G. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 10, n. 2, p .1-5, 2005.
- BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1991. 542p.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta Amazon.**, v. 7, p. 1-74, 1977.
- CARVALHO, D. M.G. Anatomia foliar de *Cassia ensiformis* Vell. (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Arq. JBRJ**, v.27, p.157-169, 1983-1985.
- CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. 5 ed. ILLinois: University of Chicago, 1932. p. 86.
- CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 18, n.5, p. 609-636, 1999.
- COSTA, A. F. - **Farmacognosia - vol. I**. 3º ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. 1031 p.
- CRONQUIST A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Coloumbia University Press, 1981.1262p.
- DE-PAULA, O.C.; OLIVEIRA, D.M.T. Variação da estrutura carpelar em seis espécies de Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta Bot. Bras.** v.21, n.4, p. 915-925, 2007.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4 ed., Oxford: Pergamon Press, 1990. 588 p.
- FRANCINO, D.M.T., SANT'ANNA-SANTOS, B.F., SILVA, K.L.F.; THADEO, M.; MEIRA, R.M.S.A.; AZEVEDO, A.A. Anatomia foliar e caulinar de *Chamaecrista trichopoda* (Caesalpinioideae) e histoquímica do nectário extrafloral. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.695-705. 2006.
- GABE, M. **Techniques Histologiques**. Paris: Masson e Cie, 1968. 1113p.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and pratice**. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 1962. 408 p.

- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940. 523p.
- LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Subepidermal idioblasts in leaflets of *Caesalpinia pulcherrima* and *Parkinsonia aculeata* (Leguminosae; Caesalpinioideae). **Bull. Torrey Botanic. Club**, v.120, p.319-326, 1993.
- LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. **Plant Syst. Evol.**, v.192, p.231-255, 1994.
- LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of Tribe Caesalpinieae (Leguminosae; Caesalpinioideae). **Plant Syst. Evol.**, v. 200, n. 1-2 , p. 21-39, 1996.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 608p.
- MARABESI, M.A. Efeito do alto CO₂ no crescimento inicial e na fisiologia da fotossíntese em plântulas *Senna alata* (L.) Roxb. 2007. 78p. Tese (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)- Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- METCALFE, C. F.; CHALK L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Vol. I. Oxford: Clarendon Press, 1950. 724p.
- MONTEIRO, W.R.; CASTRO, M.M.; GIULIETTI, A.M. Aspects of leaf structure of some species of *Leiotrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) from Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil). **R. Bras. Bot.**, v.7, p.137-147, 1985.
- MOREIRA-CONEGLIAN, I.R.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). **R. Bras. Bot.**, v.29, n.2, p.193-207, 2006.
- ORDOÑEZ, M. G.; GOVÍN, E. S.; BLANCO, M. de los A. G. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v.9, n.1, p.0-0, 2004.
- PIEME, C. A.; PENLAP, V.N.; NKEGOUM, B.; TAZIEBOU, C.L.; TEKWU, E.M.; ETOA, F. X.; NGONGANG, J. Evaluation of acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Caesalpinieae). **Afric. J. Biotechnol.**, v.5, n.3, p.283-289, 2006.
- PLANTAMED – **Plantas e Ervas Medicinais e Fitoterápicos** Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna_alata.htm> Acesso em: 30 abr. 2007.

- POLHILL R.M.; RAVEN P.H.; STIRTON C.H. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: Polhill, R.M.; Raven, P.H. (Eds.) **Advances in Legume Systematics part 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.1-26.
- RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* (L.) Roxb. por duas metodologias. **Planta Daninha**. prelo.
- RODRIGUES, R. S.; FLORES, A. S.; MIOTTO, S. T. S.; BAPTISTA, L. R. DE M. O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil **Acta Bot. Bras.** v.19, n.1, p.1-16, 2005.
- SOLEREDER, H. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Oxford: Clarendon Press, 1908.1182p.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia – princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 260p
- SOUZA-FILHO, A.P.S. **Alelopatia e as Plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2006. 159p.
- WATSON, L. An automated system of generic description for Caesalpinioideae, and its application to classification and key-making. In: Polhill, R.M.; Raven, P.H. (Eds.) **Advances in Legume Systematics part 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 65 – 80.

CONCLUSÕES GERAIS

Ambos, alelopatia e auto-intoxicação, governam mecanismos importantes na regulação da biodiversidade e produtividade das plantas. A alelopatia é um fenômeno que envolve complexa cadeia de comunicação química entre as espécies vegetais e exerce papel significante na agricultura sustentável. Este estudo teve como finalidade o levantamento de potenciais aleloquímicos de *Senna alata* (L.) Roxb., espécie daninha que infesta pastagens cultivadas da região Norte do Brasil, apresentando crescimento vegetativo extremamente rápido com tendência à formação de estandes puros.

Foram realizados experimentos para a identificação, por testes fitoquímicos, das principais classes de compostos potenciais aleloquímicos, encontradas nas diferentes estruturas desta espécie; e para avaliação da atividade potencial autotóxica e alelopática dos extratos provenientes de tais estruturas, sobre a germinação de sementes e o alongamento inicial de duas plantas daninhas e uma forrageira de áreas de pastagens cultivadas da região Amazônica.

Nestas primeiras análises, foi comprovada a alta diversidade de compostos químicos presentes em todas as estruturas de *Senna alata*, especialmente em suas folhas. Os resultados obtidos nos experimentos em alelopatia mostram a existência de um padrão diferenciado de síntese e/ou conteúdo de substâncias alelopáticas e autotóxicas nas diversas partes da planta *S. alata*, e que provavelmente o sítio de maior biossíntese esteja situado em suas folhas. Os efeitos autotóxicos dos extratos hidrometanólicos de *S. alata*, são somente percebidos no crescimento inicial da plântula, afetando em maior parte a porção subterrânea desta.

Diante dos resultados expostos foram realizados mais dois experimentos: prospecção das substâncias químicas em folhas de *S. alata*, com atividade alelopática inibitória sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de *Senna obtusifolia*, *Mimosa pudica* e *S. alata*; e estudos anatômicos das folhas e testes histoquímicos para a localização e identificação dos aleloquímicos nas células do mesofilo.

Foram encontrados nas folhas de *S. alata*, flavonóides glicosilados, substâncias de polaridade muito alta com ação alelopática. O núcleo aromático deste flavonóide foi identificado, por dados de Ressonância Magnética Nuclear, como sendo kaempferol, os glicosídeos ligados ao núcleo flavônico não puderam ser identificados por presença de intensa mistura com compostos de polaridades altas, como açúcares, que não permitiram a sua separação. A mistura apresentou atividade alelopática sobre o alongamento da radícula e a germinação de *S. obtusifolia* e *M. pudica*. Já os efeitos autotóxicos destes compostos são pouco expressivos para o crescimento da plântula e

nulos sobre a germinação. Estes resultados corroboram com os encontrados nos testes preliminares realizados com todas as estruturas da planta, confirmando a potencialidade do kaempferol como um aleloquímico.

O estudo anatômico forneceu características foliares específicas de *Senna alata* que, juntamente de outros caracteres mais gerais, como lâmina foliar anfiestomática, mesofilo dorsiventral, epiderme abaxial papilosa, deposição de cera sobre as células epidérmicas, permitem sua identificação através da análise microscópica desta estrutura. A presença de tricomas glandulares em forma de clava, ao longo de sulcos sobre a nervura mediana de seus folíolos, e tricomas tectores longos, adensados na face abaxial, com granulações de cera em sua superfície são algumas das características específicas. As folhas, ainda, são ricas em cristais de oxalato de cálcio, ao longo de suas nervuras, característica da subfamília Caesalpinioideae, assim como estômatos predominantemente paracíticos. Além disso, a presença de classes de aleloquímicos de compostos fenólicos em células epidérmicas, da base de tricomas e células dispersas no parênquima paliçádico, especialmente nas proximidades da nervura mediana, no mesofilo de *S. alata*, foi confirmada.