

## SAPONINAS EM TÉPALAS NORMAIS E DEFORMADAS DE GLADIÓLO CULTIVAR ROSA DE LIMA<sup>1</sup>

P.R. Mallozzi<sup>2</sup>

M.A. Barros<sup>2</sup>

### INTRODUÇÃO

Uma doença de gladiólo, caracterizada por uma deformação na região central de tépalas, com proliferação celular, foi associada à presença de corpúsculos semelhantes à micoplasma na região do floema. Com o objetivo de pesquisar a influência da doença sobre os constituintes normais da planta, foi feita a determinação de saponinas em tépalas normais e em tépalas deformadas de gladiólo, cv. Rosa de Lima, constatando-se diferenças. Estes resultados sugerem que a deformação, caracterizada por proliferação de células, é acompanhada de alterações do metabolismo da planta.

### MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de tépalas normais e tépalas com deformação foram obtidas de gladiólo cv. Rosa de Lima, cultivado em campo experimental. Um grama de cada amostra foi finamente cortado e transferido para erlenmeyer de 200 ml de capacidade, junto com 100 ml de água destilada. Após fervura por 10 minutos, o decocto foi filtrado e recolhido em balão volumétrico de 100 ml de capacidade. O extrato aquoso assim obtido foi utilizado para as determinações de Índice de Espuma, Índice de Inibição de Espuma e Índice Hemolítico, de acordo com a metodologia de WASICKY, modificada por SILVA (1964).

<sup>1</sup>Trabalho realizado em março de 1973, terminado em maio de 1974. Os autores agradecem ao Prof. Dr. José Bonzani da Silva pela orientação e estímulo proporcionados.

<sup>2</sup>Instituto Biológico, São Paulo.

1) Determinação do Índice de espuma - A partir do extrato aquoso a 1%, foram preparadas diluições seriadas, de acordo com o quadro I.

Quadro I. Quantidades relativas, em ml, do extrato aquoso a 1% e de água destilada, para a preparação das diluições.

Tubo de ensaio	Diluição	Extrato (ml)	Água destilada (ml)
1	1:100	10,00	0,00
2	1:200	5,00	5,00
3	1:300	3,30	6,67
4	1:400	2,50	7,50
5	1:500	2,00	8,00
6	1:600	1,66	8,34
7	1:700	1,42	8,58
8	1:800	1,25	8,75
9	1:900	1,10	8,89
10	1:1000	1,00	9,00

Esta série de diluição foi depositada em dez tubos de ensaio, de 16 mm de diâmetro interno por 18 cm de comprimento. Os tubos foram fortemente agitados por 15 segundos. Após período de repouso, a altura de espuma nos tubos foi observada, constatando-se que no tubo de número 2 a altura era de 1 cm, correspondendo ao ponto de viragem. O valor do Índice de Espuma encontrado foi de 177, para as duas amostras.

2) Determinação do Índice de inibição de espuma - Foram preparadas diluições seriadas a partir do extrato aquoso a 1%, de acordo com o quadro I. Após agitação e repouso, com adição prévia de uma mistura inibidora da formação de espuma, constituída de álcool isoamílico e acetona, foi constatado que no tubo 8 o anel de espuma não apareceu, sendo portanto o Índice igual a 666, para ambas as amostras.

3) Determinação do Índice hemolítico - Em dez tubos

de ensaio foram colocados volumes de 1 ml de concentrações decrescentes do extrato da droga a 1% isotonzado, juntamente com 1 ml de suspensão de hemácias a 2%, em solução fisiológica, segundo o quadro II.

Quadro II. Determinação do índice de hemólise - quantidades relativas, em ml, dos extratos de tépalas normais e deformadas, em solução fisiológica, e de suspensão de hemácias a 2% em solução fisiológica.

Tubos de ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extrato aquoso (ml)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Solução fisiológica (ml)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Suspensão de sangue a 2% (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Após 24 horas foram feitas as leituras nos tubos e verificou-se que a hemólise se manifestou, para a amostra normal, no tubo 6 e para a amostra com deformações no tubo 3. Portanto os índices hemolíticos tiveram os seguintes valores, respectivamente 400 e 250.

4) Análise cromatográfica qualitativa dos extratos metanólicos - Extratos metanólicos a 5% de cada amostra foram preparados. Quantidades de 0,02 ml desses extratos foram aplicadas em placa de cromatografia cobertas com sílica gel G na espessura de 250 micros. O cromatograma foi desenvolvido em cuba supersaturada utilizando-se como solvente uma mistura de clorofórmio + etanol + água (4:3:0,75). As manchas foram reveladas com  $H_2SO_4$  20%.

5) Análise cromatográfica qualitativa dos extratos hidrolisados - Resíduos foram obtidos de ambas as amos-

tras de extratos metanólicos a 5%. A partir desses resí-  
duos foram hidrolisados com 50 ml de ácido clorídrico  
30%, para separação das sapogeninas que foram extraídas  
posteriormente em 100 ml de clorofórmio. Os extratos fo-  
ram concentrados até ao volume de 5 ml e quantidades de  
0,02 ml desses extratos foram aplicadas em placa de cro-  
matografia com sílica gel G. O cromatograma foi desen-  
volvido em mistura de clorofórmio + metanol (96 + 4)  
(STAHL, 1969). O revelador utilizado foi anisaldeído.

6) Análise cromatográfica em camada preparativa do  
extrato metanólico - Utilizando-se o mesmo sistema croma-  
tográfico do ítem 4, quantidade de 0,1 ml de extrato me-  
tanólico de cada amostra foi aplicada em camada prepara-  
tiva, isolando-se 5 cm da placa para aplicação de um pon-  
to e posterior revelação das manchas com solução de  
 $H_2SO_4$ .

7) Utilização do microscópio óptico para identifica-  
ção de frações hemolisantes do cromatograma - Com a fina-  
lidade de se introduzir uma técnica mais rápida de visua-  
lização de hemólise a partir de frações do cromatograma,  
um novo método foi sugerido.

As faixas obtidas no cromatograma em camada prepara-  
tiva (ítem 6) foram isoladas, raspadas e eluídas separa-  
damente em 5 ml de solução fisiológica e filtradas em pa-  
pel filtro.

Como controle foi utilizada uma faixa raspada de um  
cromatograma desenvolvido da mesma maneira, mas sem apli-  
cação de amostra.

Foram preparadas lâminas com uma gota de cada fil-  
trado das faixas isoladas, das amostras e do controle.  
A cada uma destas lâminas foi adicionada uma gota da sus-  
pensão de hemácias a 2% em solução fisiológica. Parale-  
lamente foi feita uma lâmina controle de suspensão de he-  
mácias a 2% em solução fisiológica.

Quadro III. Resultados dos cromatogramas dos extratos metanólicos das amostras de tépalas normais e tépalas deformadas.

Extrato metanólico de tépalas normais			Extrato metanólico de tépalas deformadas		
Manchas número	Rf	Cor	Manchas número	Rf	Cor
1	0,14	marrom	1	0,13	marrom
2	0,34	castanho rosado	2	0,33	castanho rosado
3	0,45	rosa	3	0,45	rosa
4	0,74	rosa	4	0,73	rosa
5	0,93	castanho	5	0,93	castanho

Os índices de espuma e de inibição de espuma não revelaram diferenças significativas entre tépalas normais e deformadas. O índice de hemólise do extrato em solução fisiológica deu valores de 400 para tépalas normais e 250 para tépalas deformadas.

O cromatograma do extrato metanólico resultou em um número de frações com Rfs semelhantes (quadro III).

O cromatograma do extrato hidrolisado de tépalas deformadas apresentou um número de manchas menor faltando frações correspondentes aos Rfs 64, 74 e 86 do cromatograma de tépalas normais (quadro IV).

As provas de hemólise com as frações obtidas no cromatograma, realizadas com a metodologia de STAHL (1960) modificada neste trabalho pelo primeiro autor, permitiram resultados mais rápidos com a utilização de suspensão de hemácias em solução fisiológica em lugar de agar-gelatina. Através deste método foi possível a visualização de alterações rápidas nas hemácias das frações 3 e 4 isoladas da cromatografia preparativa dos extratos metanólicos. Os resultados sugerem que os componentes saponínicos das tépa-



O método modificado foi ainda experimentado com saponina padrão, permitindo a visualização, em pouco tempo, das alterações nas hemácias. O método convencional da deposição de ágar-sangue direto no cromatograma pode, às vezes, apresentar o inconveniente de decomposição do sangue por microrganismos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam um efeito da doença sobre saponinas do gladiólo, refletido nos resultados do poder hemolítico que traduzem uma diferença do índice hemolítico. Como o poder hemolítico determinado para tépalas deformadas foi menor do que para tépalas normais, isto poderia significar que a quantidade de saponinas sintetizadas na planta doente é menor, ou que as diferentes saponinas tenham sofrido um desequilíbrio em consequência da doença, ou ainda que estas duas hipóteses concorram para diminuir o poder hemolítico das saponinas. SILVA (1964) não observou ação hemolítica após separação das frações por cromatografia a partir do extrato aquoso que apresentou ação hemolítica. O poder hemolítico pôde ser explicado pelo sinergismo dos componentes saponínicos no extrato aquoso.

Os resultados da cromatografia neste trabalho se ajustam à hipótese de desequilíbrio entre os componentes saponínicos do gladiólo, pela falta de três frações no cromatograma de tépalas deformadas, que poderiam corresponder a três componentes não sintetizados na planta doente. VERMA et alii (1970) observaram uma inibição da infecção por vírus em plantas quando se adicionou saponina em alta concentração ao inóculo. Entretanto não há referências no papel dos componentes e nem foi tentada a separação dos mesmos. Os dados obtidos neste trabalho indicam a necessidade de mais experimentos para determinar o real papel dos componentes saponínicos em relação às doenças de plantas.

#### RESUMO

Amostras de tépalas normais e deformadas por uma

doença associada a micoplasma, com proliferação de células, de gladiolo cv. Rosa de Lima foram submetidas às provas de Índice de Espuma, Índice de Inibição de Espuma, e Índice de Hemólise e Cromatografia em Camada Delgada para determinação de constituintes saponínicos.

Os resultados revelaram diferenças no poder hemolítico e no cromatograma de extratos hidrolisados de tépals normais e deformadas, indicando que a doença além da proliferação celular, é acompanhada de alterações na síntese de saponinas da planta.

#### SUMMARY

Samples of healthy and malformed tepals associated with mycoplasma disease of gladiolus cv. Rosa de Lima were submitted to foam, foam inhibition and hemolytic tests together with TLC analysis for saponin determination.

Results showed differences in the normal and malformed tepals saponin indicating that the disease, besides inducing cell proliferation, may disturb the saponin synthesis in the plant.

#### LITERATURA CITADA

- MALLOZZI, P.R. & M.S. BARROS, 1974. Estruturas do tipo micoplasma encontradas em flores deformadas de Palmeira-de-Santa-Rita (*Gladiolus* sp.). **O Biológico** 40: 101-105.
- SILVA, J.B., 1964. Algumas pesquisas sobre saponinas da *Luffa operculata*. **Rev. Fac. Farm. Bioquím. S. Paulo** 2(2): 153-160.
- STAHL, E., 1960. **Thin-layer chromatography**, 2<sup>a</sup> ed., Verlag, Berlin, p. 346.



- WASICKY, R., 1942. Novo método para dosagem de saponinas. *An.Fac.Farm.Odont.Univ.S.Paulo* 2:63-76.
- VERMA, V.S. & S.P. RAYCHANDURI, 1970. Effect of saponin on the infectivity of potato virus X. *Zentbl. Bakt. Parasitik.de Abt Z.* 125(2):113-118.