

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

Viviane de Cassia Pereira¹, Enzo Monte Canedo², Edson Rodrigues-Filho²,
Ana Carolina Alves dos Santos², Patrícia Umeda Grisi¹, Maristela Imatomi¹, Simoni Anese¹,
Eduardo Habermann³ & Sonia Cristina Juliano Gualtieri¹

¹Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Botânica, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, CEP 13565-905, São Carlos.

²Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, CEP 13565-905, São Carlos.

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências Exatas e Tecnologia de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto. vivicpereira@gmail.com

Recebido em 10.IX.2014

Aceito em 6.V.2016

RESUMO – As saponinas, grupo químico característico da família *Sapindaceae*, apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e estudos anteriores revelaram que extratos brutos exerceram efeitos fitotóxicos em espécies bioindicadoras e infestantes. Esta pesquisa avaliou a fitotoxicidade de frações ricas em saponinas obtidas a partir de extratos do pó de folhas, caules e raízes de *Serjania lethalis* A. St-Hil, uma liana encontrada no cerrado. O potencial fitotóxico das frações foi avaliado por meio do bioensaio de alongamento de coleótilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L.). O controle negativo foi feito com solução tampão e o controle positivo com o herbicida oxifluorfen. Os resultados obtidos indicaram que estas frações apresentam potencial fitotóxico, sendo as provenientes de raiz e folhas de *S. lethalis* as mais fitotóxicas para os coleótilos, porém uma fração proveniente do caule também mostrou-se ativa. Algumas frações provenientes dos mesmos órgãos acima citados apresentaram efeito semelhante ao causado pelo herbicida oxifluorfen.

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

ABSTRACT – Phytotoxic potential of leaves, roots and stems from *Serjania lethalis* A. St.-Hil. Saponins are a chemical group characteristic of the Sapindaceae family, with a broad spectrum of biological activities. Previous studies have shown that crude extracts exerted phytotoxic effects on bioindicator species and weeds. This research evaluated the phytotoxicity of fractions high in saponins obtained from extracts of the powdered leaves, stems and roots of *Serjania lethalis* A. St.-Hil., a liana found in the Cerrado. The phytotoxic potential of the fractions was assessed by the etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptile bioassay. The buffer solution was used as the negative control and the positive control was with the herbicide oxyfluorfen. The results indicated that these fractions have phytotoxic potential, with the root and leaves of *S. lethalis* the most phytotoxic to coleoptiles but a fraction from the stem also proved to be active. Some fractions from the same organs above had similar effect as that caused by the herbicide oxyfluorfen.

Keywords: solid phase extraction, phytotoxicity, saponins

INTRODUÇÃO

Serjania lethalis A. St.-Hill. (*Sapindaceae*) é uma liana tipicamente encontrada no cerrado brasileiro (Fernandes & Negreiros 2001) e pertencente à família *Sapindaceae*, a qual é conhecida por ser uma rica fonte de saponinas (Murgu & Rodrigues-Filho 2006). As saponinas pertencem a um grupo de glicosídeos amplamente distribuídos no reino vegetal, são solúveis em água e formam espuma quando agitadas (Tyler *et al.* 1981). Possuem elevada massa molecular (600 a 2000 Da) e são constituídas por uma parte lipofílica e outra hidrofílica, composta por açúcares que formam cadeias lineares ou ramificadas (Simões *et al.* 2003).

As saponinas são classificadas em dois grupos de acordo com a natureza do esqueleto de aglicona: as saponinas esteroidais, características de monocotiledôneas, e as saponinas triterpênicas, comuns em espécies de eudicotiledôneas (Bruneton 1995). São listadas diversas atividades biológicas para as saponinas, como atividade

hemolítica, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, antitumoral, citotóxica, antiviral (Sparg *et al.* 2004) e reguladora do crescimento de plântulas (Ohara & Ohira 2003).

Poucos estudos relatam o potencial das saponinas como agentes fitotóxicos. O trabalho desenvolvido por Hernández-Carlos *et al.* (2011) discute que saponinas provenientes da família Cucurbitaceae são promissoras herbicidas naturais, uma vez que apresentaram efeitos fitotóxicos sobre a germinação e crescimento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), azevém (*Lolium perenne* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.). Estudos anteriores revelaram que extratos de folhas de *S. lethalis* foram fitotóxicos para a germinação e crescimento do capim-colonião (*Panicum maximum*) (Pereira *et al.* 2014), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (Grisi *et al.* 2013), sugerindo que esta liana pode ser uma espécie promissora na busca de compostos com propriedade bioherbicida (Grisi *et al.* 2011).

Com base no que a literatura oferece de informações a respeito das atividades biológicas de saponinas e com o intuito de ampliar o conhecimento da fitotoxicidade de *S. lethalis*, objetivou-se testar a fitotoxicidade de frações ricas em saponinas presentes em folhas, raízes e caules sobre o alongamento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis* foram coletados de diferentes indivíduos na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' - 22° 00' S e 47° 51' - 47° 52' W). O material vegetal foi seco em estufa de circulação a 40 °C durante 72 h, em seguida foi triturado em moinho elétrico e armazenado em sacos plásticos devidamente lacrados (Pereira *et al.* 2015). Foi depositado um exemplar no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar - voucher 8340).

Preparação dos extratos e frações

Para o processo de extração por meio do protocolo 1 foram pesados separadamente 1 g de pó de folhas, raízes e caules de *S. lethalis* e transferidos para tubos Falcon, onde foram adicionados 5 mL de metanol e agitados em Vortex. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água deionizada e novamente agitados. Os frascos foram colocados em ultrassom por 10 minutos; em seguida foram centrifugados e retirados 10 mL do sobrenadante e ao resíduo foram adicionados mais 10 mL de água deionizada e 5 mL de metanol, sendo o conteúdo novamente agitado e colocado em ultrassom. As três alíquotas foram transferidas para novos tubos e foram centrifugadas. Em cada uma das alíquotas, foram adicionados 10 mL de água deionizada. O protocolo 2 seguiu o mesmo procedimento, diferenciando apenas na quantidade inicial de metanol e água deionizada, que foram de 10 mL e 5 mL, respectivamente.

O processo de pré-purificação foi feito utilizando um cartucho (ODS, 500 mg) ativado com 5 mL de metanol e este foi condicionado com 10 mL de metanol/água (1:9). O material extraído foi dissolvido em 5 mL de metanol/água (1:9) e aplicado no cartucho condicionado; desta forma foi obtida a fração 1 (Fr1). Em seguida, o cartucho foi eluído com 3 mL metanol/água (3:7) produzindo a fração 2 (Fr2); a fração 3 (Fr3) foi obtida com a eluição de 3 mL de metanol/água (1:1); a fração 4 (Fr4) com a eluição de 3 mL de metanol/água (7:3) e, finalmente, a fração 5 (Fr5) com 3 mL de metanol. A tabela 1 apresenta a nomenclatura adotada. A figura 1 esquematiza o processo de extração e pré-purificação.

Foram avaliadas as frações C1.1; C2.1; F1.1; F1.3; F2.1; F2.3; R1.1; R1.2; R1.5; R2.1 e R2.2, pois estas foram as que apresentaram massa igual ou superior a 10 mg, suficiente para a realização do bioensaio.

Bioensaio de alongamento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*)

A avaliação da atividade fitotóxica foi feita por meio do bioensaio de alongamento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon) estiolados. Para tanto, cariopses de trigo foram germinadas em água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25° C, por 3 dias, em ausência de luz (Macías *et al.* 2010). Posteriormente, sob luz verde (Nitsch & Nitsch 1956), os coleótilos foram cortados em 4 mm com uma guilhotina de Van der Weij, sendo descartados os 2 mm apicais (Macías *et al.* 2010).

As frações foram dissolvidas em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g L⁻¹), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g L⁻¹) e 2% de sacarose e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções das frações foram testadas nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 mg mL⁻¹. Cada tratamento foi testado em triplicata, com adição de 2 mL de cada solução em tubos de ensaio e cinco fragmentos de coleótilos de trigo em cada tubo. Como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial GOAL® (oxifluorfen 240 g L⁻¹) nas mesmas concentrações

Tabela 1. Nomenclatura das frações obtidas de cada material vegetal (folhas, raízes e caule) com seus respectivos eluentes. *F1.1 = Fração obtida por meio do protocolo 1 com o primeiro eluente. *F2.1 = Fração obtida por meio do protocolo 2 com o primeiro eluente.

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

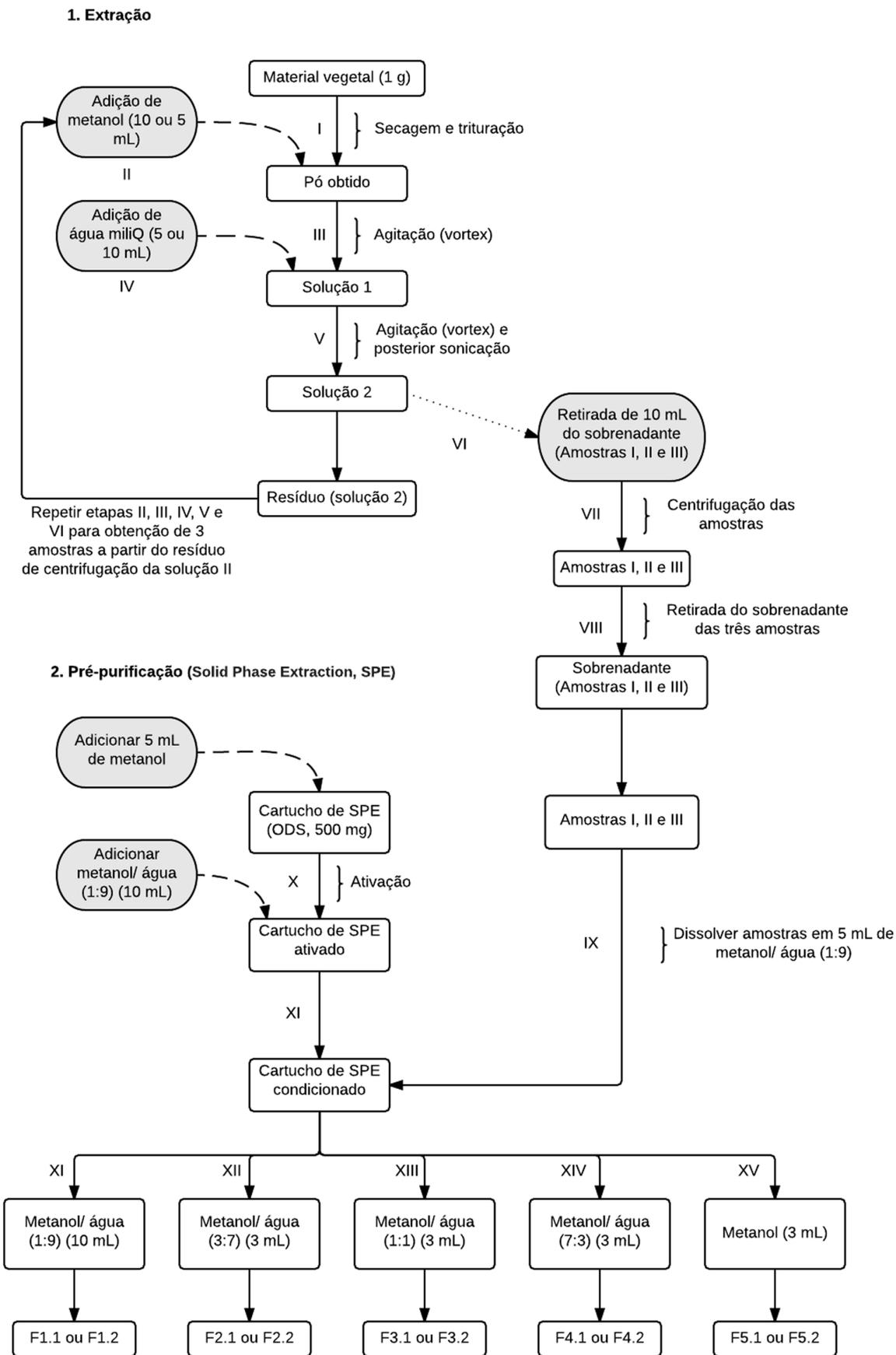


Fig 1. Fluxograma do processo de extração e Pré-purificação de extratos de folhas, raízes e caules de *Serjania lethalis*. F indica as frações produzidas, tanto de folhas, quanto de caules e raízes.

que as frações e como controle negativo foi utilizada a solução tampão. Os tubos foram acondicionados em rotor e mantidos em B.O.D. com rotação de 25 rpm durante 24 h e ausência de luz (Macias *et al.* 2010). Posteriormente, os coleóptilos foram retirados dos tubos, fotografados e o comprimento foi medido com o auxílio do programa “ImageJ”.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando essas duas pressuposições foram atendidas foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Os dados da figura 1 foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, onde o “zero” representa a longitude do controle, enquanto os valores positivos implicam no estímulo da característica analisada e os negativos na inibição (Novaes *et al.* 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de extração em fase sólida permitiu a obtenção de frações ricas em saponinas. O cartucho de sílica de fase reversa (C-18) utilizado reteve compostos de maior apolaridade e permitiu a extração de compostos mais polares. Esta característica da fase estacionária associada com o grau crescente nas proporções de metanol e água utilizadas permitiu que as frações iniciais apresentassem maior quantidade de compostos solúveis em água, mas o aumento da proporção de metanol (Fr4 e Fr5) permitiu que fossem concentradas nestas frações. Assim, assumiu-se que as saponinas estavam presentes principalmente nas

frações F1.4; F1.5; F2.4; F2.5; R1.4; R1.5; R2.4; R2.5; C1.4; C1.5; C2.4 e C2.5.

Todas as amostras apresentaram atividade inibitória no alongamento dos coleóptilos de trigo, exceto a amostra R1.2. Nota-se que a amostra R1.5 foi responsável pela maior porcentagem de inibição do alongamento dos coleóptilos em todas as concentrações testadas: 0,8; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ (-34,43% (4,10 mm); -34,34% (4,15 mm); -30,11% (5,05 mm), respectivamente). As amostras F2.3; R1.1; F1.3; F1.1 e C1.1 também inibiram o alongamento dos coleóptilos em todas as concentrações avaliadas, enquanto as amostras R2.1; R2.2 e F2.1 inibiram o alongamento dos coleóptilos apenas nas concentrações 0,8 e 0,4 mg mL⁻¹. A amostra C2.1 apresentou atividade inibitória apenas na concentração 0,8 mg mL⁻¹. O controle feito com o herbicida oxifluorfen inibiu o alongamento dos coleóptilos em todas as concentrações (Fig. 2).

A inibição provocada pela fração R1.5 pode ser explicada pelo fato desta fração ser provavelmente a mais enriquecida em saponinas, uma vez que foi utilizado apenas metanol durante a eluição. As demais frações (C1.1; C2.1; F1.1; F1.3; F2.1; F2.3; R1.1; R2.1 e R2.2) que também apresentaram taxa de inibição, possuem compostos polares que foram extraídos durante a eluição com metanol e água, sendo tais compostos fitotóxicos para o alongamento dos coleóptilos de trigo.

O potencial fitotóxico de extratos de folhas de *Serjania lethalis* é conhecido (Pereira *et al.* 2014). Oleszek (1993) relatou que saponinas extraídas de alfafa (*Medicago sativa* L.) foram fitotóxicas para a germinação de sementes de trigo. Porém, algumas saponinas estimularam o alongamento dos coleóptilos, sendo estes menos sensíveis às saponinas do que as raízes de trigo. As propriedades biológicas das

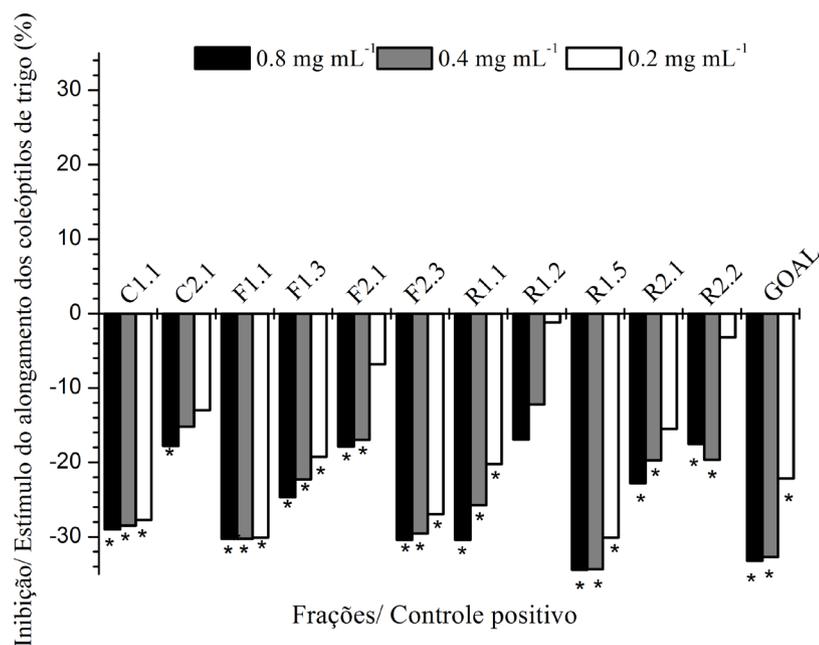


Fig. 2. Efeito inibitório das frações extraídas de folha, raízes e caule de *Serjania lethalis*, em diferentes concentrações, no alongamento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) Diferença significativa em relação ao controle negativo, de acordo com o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

saponinas estão relacionadas ao seu caráter anfífilico e a sua capacidade em formar complexos com proteínas, esteroides e fosfolípidios de membranas, alterando sua permeabilidade ou destruindo-as (Hostettmann & Marston 2005). Ainda, as saponinas apresentam efeitos negativos sobre hormônios de crescimento vegetal, como auxinas e giberelinas (Waller *et al.* 1993).

Saponinas isoladas de folhas de *Xylopiya aethiopioca* foram fitotóxicas para o crescimento dos brotos e raízes da soja (*Glycine max.* L. Merrill) e plântulas de milho (*Zea mays* L.), assim como para sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.); neste mesmo estudo é relatado que o potencial fitotóxico das saponinas foi linearmente correlacionado com as concentrações testadas (Edewor *et al.* 2009).

Ohara & Ohira (2003) avaliaram o crescimento e germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) na presença da saponina betulina, e afirmaram que o crescimento radicular das plântulas foi mais afetado do que o hipocótilo. Neste mesmo trabalho também foi testado o potencial fitotóxico do ácido betulínico e concluiu-se que o crescimento de radículas de alfafa foi inibido por este triterpenóide. Trabalhos como este corroboram os resultados obtidos no presente estudo, no qual houve o registro de que as

frações provenientes de extratos de folhas, raízes e caule de *S. lethalis* extraídas com metanol e água são ricas em saponinas, inibindo o alongamento dos coleótilos de trigo.

Os coleótilos que cresceram sob o efeito da fração R1.5 nas concentrações 0,8 e 0,4 mg mL⁻¹ apresentaram médias de alongamento (4,10 e 4,15 mm) estatisticamente iguais às obtidas no tratamento com o herbicida oxifluorfen nas mesmas concentrações (4,20 e 4,23 mm) (Tab. 2). Em alguns casos, os efeitos inibitórios provocados pelas frações foram superiores aos causados pelo herbicida, como é o caso das frações C1.1; F1.1 e F2.3 na concentração 0,2 mg mL⁻¹ (Tab. 2). A fração obtida de raízes de *S. lethalis* apresentou elevada fitotoxicidade nas maiores concentrações; entretanto, as frações obtidas do caule e folhas foram mais ativas nas menores concentrações.

A maior taxa de inibição foi provocada pela fração R1.5, obtida das raízes de *S. lethalis*. Frações ricas em saponinas presentes em folhas e raízes apresentaram-se mais fitotóxicas para o alongamento de coleótilos de trigo porém uma fração proveniente do caule mostrou-se promissora para futuros estudos de fitotoxicidade desta espécie por apresentar atividade fitotóxica superior ao efeito provocado pelo herbicida oxifluorfen.

Tabela 2. Comprimento médio dos coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à atividade do herbicida oxifluorfen e das frações de folhas, raízes e caule de *Serjania lethalis* em diferentes concentrações. Média ± Desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade e médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Tratamento	Comprimento (mm)			
	0.8 mg.mL ⁻¹	0.4 mg.mL ⁻¹	0.2 mg.mL ⁻¹	Controle
C1. 1	4.50 ± 0.77 Abb	4.53 ± 0.27 BCb	4.56 ± 0.82 Cb	6.32 ± 0.17 a
C2. 1	5.20 ± 1.00 Ab	5.36 ± 1.21 Aab	5.50 ± 1.60 Bab	6.32 ± 0.17 a
F1. 1	4.43 ± 1.65 Abb	4.40 ± 0.49 Cb	4.53 ± 0.69 Cb	6.32 ± 0.17 a
F1. 3	4.76 ± 0.80 Abb	4.93 ± 0.96 Bb	5.00 ± 1.56 Bb	6.32 ± 0.17 a
F2. 1	5.20 ± 0.60 Ab	5.26 ± 0.92 Abb	5.90 ± 1.14 Abab	6.32 ± 0.17 a
F2. 3	4.40 ± 0.48 Abb	4.46 ± 0.43 Cb	4.60 ± 0.49 Cb	6.32 ± 0.17 a
R1. 1	4.40 ± 0.55 Abb	4.70 ± 1.01 BCb	5.00 ± 1.46 Bb	6.32 ± 0.17 a
R1. 2	5.20 ± 1.16 Aa	5.56 ± 0.46 Aa	6.20 ± 2.80 Aa	6.32 ± 0.17 a
R1. 5	4.10 ± 0.67 Bb	4.15 ± 0.25 Cb	5.05 ± 0.92 Bb	6.32 ± 0.17 a
R2. 1	4.90 ± 0.35 Abb	5.00 ± 1.78 Bb	5.30 ± 1.61 Abab	6.32 ± 0.17 a
R2. 2	5.20 ± 1.00 Ab	5.10 ± 0.53 Bb	6.10 ± 1.00 Aab	6.32 ± 0.17 a
Oxifluorfen	4.20 ± 0.61 Bb	4.23 ± 0.33 Cb	4.90 ± 1.06 BCb	6.32 ± 0.17 a

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro e bolsas concedidas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida ao segundo autor (Proc. 2011/09580-4).

REFERÊNCIAS

- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publishing, Paris. 1136 p. Edewor, T., Ibikunle, G.J. & Usman, L.A. 2009. Phytotoxic and antimicrobial screening of Saponin isolated from ethanolic leaf extract of *Xylopiya aethiopioca*. Science Focus 14(4):507-512.
- Fernandes, G.W. & Negreiros, D. 2001. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. Ecological Entomology 26(1):46-55.

- Grisi, P.U., Gualtieri, S.C.J., Ranal, M.A. & Santana, D.G. 2011. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. *Planta Daninha* 29(2):311-322.
- Grisi, P. U.; Gualtieri, S. C. J.; Anese, S.; Pereira, V. C. & Forim, M. R. 2013. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. *Planta Daninha* 31(2):239-248.
- Hernandez-Carlos, B., González-Coloma, A., Orozco-Valencia, A.U., Ramírez-Mares, V., Andrés-Yeves, M.F. & Joseph-Nathan, P. 2011. Saponinas bioativas de *Microsechium helleri* y *Sicyos bulbosus*. *Revista Latinoamericana de Química* 38:48-48.
- Hostettmann, K. & Marston, A. 2005. *Chemistry and pharmacology of natural products – Saponins*. Cambridge University Press, EUA. 564 p.
- Macías, F.A., Lacret, R., Varela, R.M., Nogueiras, C. & Molinillo, J.M.G. 2010. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. *Journal of Chemical Ecology* 36(4):396-404.
- Murgu, M. & Rodrigues-Filho, E. 2006. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society* 17(7):1281-1290.
- Nitsch, J.P. & Nitsch, C. 1956. Studies on the growth coleoptile and first internode sections. A new sensitive straight- growth test for auxins. *Plant Physiology* 31(2):94-111.
- Novaes, P., Imatomi, M., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Lacret, R., Gualtieri, S.C.J. & Macías, F.A. 2013. Allelopathic Potential of *Rapanea umbellata* Leaf Extracts. *Chemistry & Biodiversity* 10(8):1538-1548.
- Ohara, S. & Ohira, T. 2003. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *Journal of Wood Sciences* 49:59-64.
- Oleszek, W. 1993. Allelopathic potentials of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins: Their relation to antifungal and hemolytic activities. *Journal of Chemical Ecology* 19(6):1063-1074.
- Pereira, V.C., Grisi, P.U., Dodonov, P., Anese, S., Toffano, L. & Gualtieri, S.C.J. 2014. Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* sobre a germinação e crescimento de *Panicum maximum*. *Biotemas* 27(1):29-35.
- Pereira, V.C., Anese, S., Imatomi, M., Grisi, P.U., Canedo, E.M., Gualtieri, S.C.J., Rodrigues-Filho, E. 2015. Phytotoxic potential of *Serjania lethalis* leaves on *Sesamum indicum*. *Acta Biológica Colombiana* 20(1): 31-37.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, A. & Petrovick, P.R. 2003. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, Editora Universidade do Rio Grande do Sul. 1102p.
- Sparg, S.G., Light, M.E. & STADEN, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94(2):219-243.
- Tyler, V.E., Brady, L.R. & Robbers, J.E. 1981. *Pharmacognosy*. Lea & Febiger, Philadelphia. 67p.
- Waller, G.R., Jurzista, M. & Thorne, R.L.Z. 1993. Allelopathic activity of root saponins from Alfalfa (*Medicago sativa* L) on weeds and wheat. *Botanical Bulletin* 34:1-11.