

Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni)

Mireli Fiorenza¹, Danielle Bizzi Dotto¹, Aline Augusti Boligon², Alexandra Augusti Boligon¹,
Margareth Linde Athayde² & Silvane Vestena¹

¹Universidade Federal do Pampa, Laboratório de Bioquímica, Campus São Gabriel, CEP 97300-000, São Gabriel, RS, Brasil.
svestena@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, CEP 97105-900,
Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido em 27.VI.2014.

Aceito em 15.VIII.2016.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos alelopáticos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni) sobre a germinação e crescimento inicial de *Zea mays* L., *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Trifolium pratense* L., *Lotus corniculatus* L. e, identificar e quantificar compostos químicos presentes no extrato de capim-annoni. No teste alelopático utilizou-se o extrato aquoso e na identificação e quantificação dos compostos químicos a metodologia do extrato metanólico e da infusão. Os componentes encontrados no extrato da planta foram: ácido elágico, ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e epicatequina. Como resultado, o extrato de capim-annoni mostrou efeito alelopático reduzindo e/ou inibindo a germinação de sementes, o índice de velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas em todas as espécies testadas. Este efeito possivelmente deve-se a presença dos compostos fenólicos e flavonóides.

Palavras-chave: alelopatia, extrato vegetal, metabolismo secundário

ABSTRACT – **Phytochemical analysis and allelopathic activity of *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni)** – The aim of this study was to evaluate the allelopathic effect of *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni) on seed germination and initial growth of seedlings of *Zea mays* L., *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Trifolium pratense* L., and *Lotus corniculatus*, and identify and quantify chemical compounds present in the extract of *Eragrostis plana*. For allelopathic testing, we used an aqueous extracts and the method using methanolic extract and infusions was used for the identification and quantification of the chemical compounds. The components found in the plant extract were ellagic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, rutin, quercetin, epicatechin and catechin. *Eragrostis plana* had allelopathic effects on all species tested, reducing and/or inhibiting the germination process and initial seedling development, possibly this effect was due to the presence of the phenolic and flavanoid compounds.

Keywords: allelopathy, vegetable extract, secondary metabolism

INTRODUÇÃO

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é uma Poaceae tropical, perene, estival, exótica, com origem na África, introduzida acidentalmente no Brasil como contaminante de sementes importadas, na década de 1950 como impurezas nos lotes de capim-de-rhodes (*Chloris gayana* Kunth) (Reis & Coelho 2000, Kirkman & Morris 2003). No Sul do Brasil, é considerada a invasora mais agressiva e de difícil controle em pastagens naturais (Reis 1993). Não existem levantamentos conclusivos sobre sua cobertura no Rio Grande do Sul (RS), contudo estima-se que a área infestada pelo capim-annoni seja superior a um milhão de hectares, ou aproximadamente 10 % da área do Bioma Pampa do RS (Medeiros *et al.* 2004, Ferreira *et al.* 2008).

A espécie possui atributos de planta invasora tais como: rápido crescimento, longa fase reprodutiva, presença de alelopatia e banco de sementes do solo persistente (Medeiros *et al.* 2004). Supõe-se que seus efeitos alelopáticos prejudicam a germinação de sementes de diversas espécies, fato que pode estar contribuindo para a expansão do capim-annoni sobre os campos nativos no RS (Ferreira *et al.* 2008). Para isto, a espécie produz e libera

metabólitos secundários, compostos que podem afetar o crescimento, prejudicar o desenvolvimento e até mesmo inibir a germinação de outras espécies vegetais e também microrganismos (Ferreira *et al.* 2008, De Conti & Franco 2011, Gomes *et al.* 2013).

Essas substâncias estão presentes em toda a planta, principalmente nas folhas e raízes e, são liberadas no ambiente por compostos solúveis em água, e agem na fisiologia das plantas, no alongamento e divisão celular, interferem nos mecanismos hormonais de crescimento, permeabilidade das membranas celulares, síntese proteica, abertura estomática, fotossíntese, respiração e metabolismo de lipídios e ácidos graxos (Ferreira *et al.* 2008).

Compostos fenólicos, flavonóides e taninos são os agentes mais comumente associados com o efeito alelopático (Taiz & Zeiger 2013). Os polifenóis são produtos de baixo peso molecular e são considerados de máximo interesse por se encontrarem ligados à maior parte de fenômenos biológicos, botânicos e taxonômicos (Evaristo & Leitão 2001). Esses compostos apresentam funções tais como: inibidores de crescimento, atração de polinizadores, defesas das plantas, proteção contra a radiação ultravioleta e também apresentam mecanismos

de proteção ao estresse ambiental (Feuchr *et al.* 1994, Taiz & Zeiger 2013). Os compostos fenólicos compreendem o maior grupo de metabólicos que foram identificados como alelopáticos (Carmo *et al.* 2007).

Outra classe de interesse alelopático são os flavonóides (flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, proantocianinas, isoflavonoides, entre outros), que estão presentes nas plantas em diversas formas e com variadas funções. Além das funções de pigmentos, atrativos ou repelentes de herbívoros, proteção contra radiação UV, estas substâncias apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (Shirley 1996, Taiz & Zeiger 2013).

Os taninos possuem a capacidade de se ligar a proteínas, geralmente de forma irreversível, formando precipitados. Essas substâncias estão envolvidas no processo de proteção da planta contra ataque de herbívoros invertebrados e vertebrados. Residem ainda nesta característica, o sabor adstringente e difícil digestão, já que as enzimas digestivas não conseguem metabolizar esses precipitados (Zucker 1983, Taiz & Zeiger 2013).

Apesar de serem encontrados inúmeros trabalhos na literatura relacionados ao capim-annoni, poucos se referem ao poder alelopático da espécie. Além disso, inexistem trabalhos que descrevem e quantificam substâncias presentes nesta espécie que podem possuir relação com seu poder alelopático sobre outras espécies.

Com a detecção dos princípios ativos, as substâncias aleloquímicas podem trazer alternativa ecológica para a redução de agroquímicos, podendo ser usadas como herbicidas naturais (Rosa *et al.* 2007, Rigon *et al.* 2013). Tais substâncias, produzidas pelas plantas, podem ser utilizadas como alternativa viável ao uso de herbicida (Waller 1999). Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar compostos químicos presentes em *E. plana*, verificando o efeito alelopático do capim-annoni sobre espécies cultivadas no sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, em maio de 2013, partes aéreas (caule e folhas) de capim-annoni foram coletadas no período da manhã no *Campus* da Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS. O material foi mantido em estufa de ar forçado a 60 °C durante 72 horas, para a obtenção da massa parcialmente seca. Após, toda a massa seca foi moída em um moinho tipo Willey (Labouriau & Valadares 1976).

Preparo do material

A partir do material vegetal moído, foi realizado o preparo dos extratos, utilizando-se duas formas de extração: maceração com metanol e infusão com água destilada. Para obtenção do extrato metanólico, 200 g do material vegetal moído foi adicionado a 1 L de metanol, sendo filtrado e evaporado após dois dias. A infusão foi realizada com 200

g de material vegetal seco com 1 L de água destilada, o material foi filtrado e evaporado em estufa a 40 °C, obtendo-se assim os extratos utilizados nas análises posteriores.

Para a obtenção do extrato aquoso de capim-annoni foram utilizadas folhas secas na concentração de 1 g 10 mL⁻¹ de água destilada (peso/volume). A mistura foi deixada em repouso no escuro por 48 horas na geladeira (5 ± 1 °C), sendo, após, filtrada em funil-de-Büchner, por duas vezes, usando-se papel filtro qualitativo. O extrato foi diluído em cinco concentrações diferentes (10, 30, 50, 70 e 100 %) e utilizado água destilada como tratamento controle, sendo que para a concentração de 100 % foi utilizado o “extrato puro”.

Para a realização dos bioensaios de germinação foram utilizadas sementes de *Zea mays* L. (milho), *Avena sativa* L. (aveia-branca), *Lolium multiflorum* Lam. (azevém-anual), *Trifolium pratense* L. (trevo-vermelho) e *Lotus corniculatus* L. (cornichão). Foram efetuados testes preliminares em laboratório para verificação da viabilidade e do vigor da germinação das sementes. Para os testes de germinação foram utilizadas placa-de-petri esterilizadas com 9 cm de diâmetro, forradas com dois discos de papel-filtro, sendo umedecidas com 7 mL de água destilada (controle) ou do extrato aquoso. Dez sementes das espécies cultivadas por placa-de-petri com cinco repetições (placas-de-petri) constituíram a unidade experimental. O experimento foi mantido em câmaras de germinação tipo BOD com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, 230 μmoles m⁻² s⁻¹), sob fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão radicular (Brasil 2009). O experimento foi mantido por um período de 10 dias, sendo que diariamente foi verificado o número de sementes germinadas. Os dados de crescimento inicial das plântulas foram coletados, ao final dos 7 dias de experimento, sendo que o comprimento, em centímetros, da raiz e da parte aérea, foi efetuado com auxílio de um paquímetro. A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi realizada por meio de contagens diárias do número de sementes germinadas (Maguire 1962).

Determinação de polifenóis totais

A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu, seguindo o método descrito por Boligon *et al.* (2009). Assim, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 2 N foi adicionado a 1 mL do extrato metanólico e da infusão de capim-annoni, ambos na concentração de 0,15 mg mL⁻¹. Essa solução foi deixada em repouso por 5 minutos sendo após adicionado 2 mL de Na²CO³ a 20 %. A solução obtida foi deixada em repouso por 10 minutos antes da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730 nm, com análises realizadas em triplicata.

O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de planta seca. A equação obtida para a curva padrão do ácido gálico foi $y = 52.167x - 0.0631$ ($r = 0.9999$).

Determinação de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky & Salatino (1998). Foram adicionados 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2 % em 1 mL de solução da amostra ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$), tanto para o extrato metanólico quanto para a infusão de capim-annoni. Após 15 minutos, as absorvâncias foram lidas em 420 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de flavonóides utilizou-se a curva padrão de quercetina ($Y = 0.0045x - 0,014$ ($r = 0,9997$)). Os teores de flavonóides foram determinados em miligrama de quercetina por grama de planta seca.

Determinação de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi realizado utilizando-se o método descrito por Morrison *et al.* (1995) com algumas modificações. As amostras, em concentrações de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, 5 mL da solução A (1 g de vanilina em 100 mL de metanol) e solução B (8 mL de HCl em 100 mL de metanol) foram utilizados para ensaio. As amostras foram lidas a 500 nm em espectrofotômetro. Para tal, 5 mL das soluções A (1 g de vanilina em 100 mL de metanol) e B (8 mL de HCl em 100 mL de metanol) foram adicionados a 1 mL do extrato metanólico e da infusão de capim-annoni, ambos na concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$. Após, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm.

O teor de tanino total foi expresso em miligramas equivalentes de catequina por grama de cada fração. A equação obtida para a curva de calibração de catequina foi $Y = 0.00015x - 0,005$ ($r = 0,9989$). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quantificação de fenóis e flavonóides por CLAE

Para a análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi utilizado um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) e auto injetor Shimadzu (SIL-20A), equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) ligadas a um desgaseificador (20A5 DGU) com um integrador (CBM 20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e software (LC solution SP1 1.22).

As análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa, sob condições de gradiente, utilizando coluna C18 (4,6 x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro 5 mm. A fase móvel utilizada foi água contendo 2 % de ácido acético e metanol (Kamdem *et al.* 2012).

O extrato metanólico e a infusão de capim-annoni foram analisados a uma concentração de 20 mg mL^{-1} . O fluxo usado foi de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção utilizados foi 50 mL e os comprimentos de onda foram: 271 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 327 nm para o ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido elágico, e 365 nm para a quercetina e rutina. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 mm (Millipore) e em seguida desgaseificadas por banho de ultra-som. As soluções de referência foram preparadas na fase móvel para HPLC nas concentrações de $0,050\text{-}250 \text{ mg mL}^{-1}$ para catequina, epicatequina, quercetina e rutina; e $0,20\text{-}200 \text{ mg mL}^{-1}$ para ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os dos padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). A curva de calibração para o ácido gálico foi: $Y = 13569x + 1344,9$ ($r = 0,9995$); catequina: $Y = 10932x + 1258,0$ ($r = 0,9987$), ácido clorogênico: $Y = 12573x + 1206,5$ ($r = 0,9997$); ácido cafeico: $Y = 11872x + 1570,3$ ($r = 0,9996$); ácido elágico: $Y = 12653x + 1367,5$ ($r = 0,9991$); quercetina: $Y = 13620x + 1337,6$ ($r = 0,9996$), rutina: $Y = 15983x + 1321,5$ ($r = 0,9998$) e epicatequina: $Y = 16423x + 1853,2$ ($r = 0,9998$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 5% de significância. Quando detectadas diferenças, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que os extratos aquosos de folhas secas de capim-annoni reduziram e/ou inibiram o percentual de germinação de todas as espécies testadas (milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão) quando comparado ao tratamento controle (Tab. 1).

Os extratos aquosos de capim-annoni mostraram efeito alelopático sobre as espécies forrageiras, sendo que para azevém-anual e cornichão a germinação foi inibida a partir da concentração de 30 %, com paralisação total da germinação das sementes na concentração de 50 %. Para aveia-branca e trevo-vermelho, a inibição teve início com a concentração de 10 % e ocorreu a paralisação total da germinação quando foi utilizado o extrato puro, ou seja,

Tabela 1. Porcentagens média de germinação com seus respectivos desvios padrão de sementes de milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão cultivadas em extratos aquosos de folhas secas de capim-annoni. Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Espécie vegetal	Concentração do extrato (%)					
	0	10	30	50	70	100
Milho	72 ± 0,10 a	58 ± 0,71 b	42 ± 2,55 b	42 ± 0,45 b	42 ± 0,08 b	42 ± 0,20 b
Aveia-branca	66 ± 0,71 a	34 ± 0,84 b	18 ± 1,14 c	16 ± 0,71 c	12 ± 0,55 c	0 ± 0,00 d
Azevém-anual	60 ± 0,45 a	60 ± 1,22 a	28 ± 1,64 b	0 ± 0,00 c	0 ± 0,00 c	0 ± 0,00 c
Trevo-vermelho	70 ± 0,45 a	46 ± 0,71 b	12 ± 0,84 c	4 ± 1,34 d	4 ± 0,45 d	0 ± 0,00 d
Cornichão	62 ± 1,48 a	56 ± 1,64 a	32 ± 2,70 b	0 ± 0,00 c	0 ± 0,00 c	0 ± 0,00 c

na concentração de 100 %. No milho houve uma redução no percentual germinativo a partir da concentração de 10 %, quando comparado ao tratamento controle, que se manteve nas demais concentrações (Tab. 1).

Independente da concentração do extrato aquoso, o percentual de germinação de todas as espécies cultivadas foi afetado com o aumento das concentrações utilizadas. Este fato é bem evidente nas concentrações mais elevadas (50, 70 e 100 %), em que foram registrados os menores valores de germinação ou parada completa do processo de germinação das sementes. Também testando o potencial alelopático de capim-annoni na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais, Ferreira *et al.* (2008) constaram que capim-tanzânia (*Megathyrsus maximus* B. K. Simon e S. W. L. Jacobs), macega-do-banhado (*Paspalum regnellii* Mez) e alface (*Lactuca sativa* L.) escaparam do efeito alelopático, mas a grama-de-forquilha (*Paspalum notatum* Flügge) e capim-kazungula (*Setaria sphacelata* (Schumacher) Staff e C. E. Hubb ex Chipp. foram afetadas significativamente pelos princípios aleloquímicos do capim-annoni.

Avaliando-se o potencial alelopático de extratos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) sobre a germinação e crescimento de azevém-anual, foi verificado que os extratos de folhas secas de mamoneira nas concentrações de 16 e 32 % inibiram totalmente a germinação de sementes de azevém-anual (Rigon *et al.* 2013). Testando-se o efeito de quatro concentrações (0, 25, 50 e 100 %) de extratos aquosos de quatro cultivares de aveia-branca (IPR 126, FAPA 2, Fundacep Fapa 43 e UTF Iguaçu) e cinco cultivares de aveia-preta (UTG 9715, UTG 200075, IPR 61, UPFA 21 Moreninha e Preta Comum) sobre a germinação de azevém-anual, foi verificado que as cultivares de aveia-branca proporcionaram maiores potenciais alelopáticos na inibição da germinação (Hagemann *et al.* 2010). Os autores ainda observaram que os extratos das cultivares IPR 125, FAPA 2 e UTF Iguaçu inibiram a germinação com as concentrações de 50 %. As sementes submetidas aos restantes dos extratos responderam negativamente com o aumento das concentrações, sendo que mesmo a concentração de 100 % não foi o suficiente para a inibição total da germinação das sementes. Analisando-se o efeito alelopático da fitomassa da leguminosa tremoço azul (*Lupinus angustifolius* L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de milho e de picão-preto (*Bidens pilosa* L.), foi observado que as folhas frescas dessa leguminosa apresentaram possível efeito alelopático, interferindo apenas no crescimento

de raiz de milho, além de efeito inibitório expressivo, confirmados pela redução e inibição da germinação e do desenvolvimento inicial, respectivamente das plântulas de picão-preto (Gomes *et al.* 2013).

No presente trabalho, o índice de velocidade de germinação (IVG) foi afetado pelos extratos aquosos de capim-annoni. Para milho, aveia-branca, azevém-anual e trevo-vermelho foi verificada redução a partir da concentração de 10 % e, a partir da concentração de 30 %, para cornichão, sendo que a redução foi intensificada com o aumento das concentrações dos extratos (Tab. 2).

Nos estudos alelopáticos, a germinabilidade (índice final de sementes germinadas) é um índice muito usado, embora não demonstre outros aspectos do processo de germinação, como atrasos, já que envolve apenas resultados finais, ignorando períodos de germinação inativa no decorrer do bioensaio (Chiapusio *et al.* 1997, Mauli *et al.* 2009). Muitas vezes, o que se observa são efeitos significativos de extratos sobre o tempo médio e velocidade de germinação e nenhuma diferença na germinabilidade em relação ao controle (Ferreira & Áquila 2000, Ferreira & Borghetti 2004). Esse efeito foi encontrado nos bioensaios realizados com todas as espécies testadas com os extratos de capim-annoni (Tab. 2). Resultados similares foram encontrados por Gatti *et al.* (2004) quando utilizaram extratos de marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.), sendo observado redução na germinação de sementes de alface com o aumento da concentração dos extratos utilizados. O mesmo comportamento foi observado por Borges *et al.* (2011) testando extratos de mamona sobre esta olerícola. De acordo com Ferreira & Borghetti (2004), quanto maior o IVG, maior é o vigor das sementes. No presente trabalho, os extratos atuaram diminuindo o vigor das sementes, evidenciando o efeito alelopático de folhas de capim-annoni sobre a germinação de todas as espécies testadas (milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão) (Tab. 2).

Os extratos aquosos de capim-annoni também interferiram no crescimento inicial de todas as espécies testadas, com redução e/ou inibição no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, sendo que com o aumento da concentração do extrato, a redução no crescimento se mostrou mais expressiva (Tabs. 3, 4).

Com a utilização de extratos de capim-annoni, o comprimento radicular e da parte aérea das espécies testadas se mostraram mais sensíveis quando comparados

Tabela 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão cultivadas em extratos aquosos de folhas secas de capim-annoni. Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

	Concentração do extrato (%)					
Milho	7,5 ± 0,09 a	4,2 ± 0,10 b	3,8 ± 0,22 b	1,8 ± 0,12 c	1,5 ± 0,05 c	1,2 ± 0,08 c
Aveia-branca	7,2 ± 0,09 a	4,5 ± 0,36 b	2,4 ± 0,54 c	2,0 ± 0,29 c	1,8 ± 0,08 c	0,0 ± 0,00 d
Azevém-anual	8,1 ± 0,20 a	3,8 ± 0,09 b	0,7 ± 0,21 c	0,0 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d	0,0 ± 0,00 d
Trevo-vermelho	8,3 ± 0,18 a	5,8 ± 0,09 b	3,5 ± 0,35 c	1,2 ± 0,09 d	0,9 ± 0,02 d	0,0 ± 0,00 e
Cornichão	8,9 ± 0,10 a	8,7 ± 0,25 a	3,6 ± 0,27 b	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c

à germinação das sementes. Entretanto, para a maioria das espécies ocorreu a inibição total no crescimento das duas partes vegetais, sendo que para cornichão a inibição foi observada a partir da concentração de 30 %; para azevém-anual e trevo-vermelho a partir de 50 %; para aveia-branca na concentração mais elevada (100 %). Para o milho, foi verificada inibição no crescimento apenas no sistema radicular a partir da concentração de 70 % e para a parte aérea, apenas redução no comprimento a partir de 30 % (Tabs. 3, 4). Assim, este resultado pode estar relacionado ao fato de que as sementes que levam mais tempo para germinar, medido pelo IVG (Tab. 2), possuem maior dificuldade para alongar o sistema radicular, pois ficam mais tempo em contato com os aleloquímicos presentes nos extratos aquosos. Adicionalmente, dentre as espécies estudadas, o milho se mostrou mais tolerante ao extrato aquoso de capim-annoni (Tabs. 2, 3).

O comprimento do hipocótilo (parte aérea) foi menos afetado que o comprimento da radícula com o aumento das concentrações (Tabs. 3, 4). Borges *et al.* (2011) e Borella *et al.* (2010) utilizando extratos de *R. communis* sobre sementes de alface e extrato de folhas de *Rollinia sylvatica* (A. St.-Hil.) Mart. sobre sementes de *Raphanus sativus* L., respectivamente, também observaram que o comprimento do hipocótilo foi menos afetado quando comparados com o crescimento radicular. Essa resposta diferente da parte aérea sobre a parte radicular com os extratos pode ser ocasionada pelas estruturas próprias de cada órgão (De Conti & Franco, 2011). Dentre os sistemas das plantas o radicular é o mais sensível à ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende das divisões celulares que, se

inibidas, comprometem o seu desenvolvimento normal (Hoffmann *et al.* 2007).

Em vários estudos, o que se observa é um efeito alelopático mais acentuado sobre o desenvolvimento inicial de uma plântula alva, sendo, muitas vezes, constatando uma redução no tamanho do eixo hipocótilo-raiz da planta quando comparado à germinação, esta por sua vez, utiliza reservas da própria semente (Áquila 2000), sendo que este mesmo efeito foi obtido no presente estudo. Resultados experimentais obtidos por vários autores mostram que todas as partes das plantas podem conter compostos alelopáticos. Bioensaios comprovam a presença desses compostos em folhas, caules aéreos, rizomas, raízes, flores, frutos e sementes de diversas espécies, sendo variáveis de espécie a espécie onde se encontra as fontes mais importantes de aleloquímicos (Rezende *et al.* 2003).

O efeito alelopático demonstrado, possivelmente, seja devido à presença de compostos fenólicos, taninos e flavonóides presentes no capim-annoni como apresentado na tab. 5. Observa-se uma maior extração de compostos fenólicos e flavonóides no extrato metanólico quando comparado com a infusão, sendo este resultado já esperado devido ao metanol possuir polaridade intermediária enquanto que a água apresenta elevada polaridade, dificultando a extração destes compostos. Ainda, os compostos fenólicos foram extraídos em maior quantidade tanto no extrato metanólico quanto na infusão, quando comparados aos flavonóides e taninos (Tab. 5).

Os fenóis são altamente distribuídos nos vegetais, apresentando propriedades de sabor, odor e coloração. Adicionalmente, é evidenciado que devido a essas propriedades apresentadas estes compostos fenólicos

Tabela 3. Médias e desvios padrão do comprimento do sistema radicular (cm) de sementes de milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão germinadas em extratos aquosos de capim-annoni. Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Espécie vegetal	Concentração do extrato (%)					
	0	10	30	50	70	100
Milho	4,7 ± 0,40 a	4,4 ± 0,65 a	1,7 ± 0,25 b	0,2 ± 0,05 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c
Aveia-branca	2,1 ± 0,45 a	1,3 ± 0,54 b	0,5 ± 0,35 c	0,3 ± 0,15 cd	0,2 ± 0,18 d	0,0 ± 0,00 d
Azevém-anual	3,0 ± 0,91 a	2,2 ± 0,30 b	0,4 ± 0,29 c	0,0 ± 0,00 d	0,0 ± 0,00 d	0,0 ± 0,00 d
Trevo-vermelho	1,3 ± 0,61 a	0,7 ± 0,5 b	0,2 ± 0,04 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c
Cornichão	0,7 ± 0,04 a	0,3 ± 0,08 b	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c

Tabela 4. Médias e desvios padrão do comprimento da parte aérea (cm) de sementes de milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão germinadas em extratos aquosos de capim-annoni. Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Espécie vegetal	Concentração do extrato (%)					
	0	10	30	50	70	100
Milho	1,5 ± 0,10 a	1,5 ± 0,25 a	0,9 ± 0,15 b	0,6 ± 0,05 bc	0,4 ± 0,06 cd	0,2 ± 0,02 d
Aveia-branca	2,2 ± 0,15 a	1,5 ± 0,24 b	0,9 ± 0,38 c	0,6 ± 0,05 c	0,2 ± 0,02 d	0,0 ± 0,00 d
Azevém-vermelho	3,4 ± 0,31 a	3,8 ± 0,15 a	1,6 ± 0,09 b	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c
Trevo-vermelho	1,2 ± 0,21 a	0,8 ± 0,05 b	0,2 ± 0,02 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 c
Cornichão	0,7 ± 0,14 a	0,5 ± 0,04 a	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b

possuem características de defesa nas plantas, na inter-relação de animais e vegetais, na atividade de inibição da germinação de sementes, no crescimento de fungos (Harborne 1997), além de alelopatia como é evidenciado no presente estudo quando se utilizou os extratos aquosos sobre todas as espécies cultivadas (Tabs. 1, 2, 3, 4).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico e da infusão de capim-annoni mostrou a presença de ácido gálico ($t^R = 11,41$ min; pico 1), catequina ($t^R = 15,27$ min; pico 2), ácido clorogênico ($t^R = 22,09$ min; pico 3), ácido cafeico ($t^R = 25,03$ min; pico 4), ácido elágico ($t^R = 29,87$ min; pico 5), epicatequina ($t^R = 33,59$ min; pico 6), rutina ($t^R = 41,67$ min; pico 7) e quercetina ($t^R = 50,13$ min; pico 8) (Fig. 1A e 1B).

A tabela 6 apresenta a quantificação dos compostos encontrados no extrato de folhas de capim-annoni. Os dois extratos apresentaram os mesmos compostos; entretanto, existe uma variação na quantidade dos mesmos que está relacionada com a polaridade do líquido extrator. Considerando o extrato metanólico, o ácido elágico foi o composto majoritário ($34,05 \text{ mg g}^{-1}$), seguido pelo ácido cafeico ($31,17 \text{ mg g}^{-1}$), rutina ($29,84 \text{ mg g}^{-1}$), ácido clorogênico ($29,30 \text{ mg g}^{-1}$) e ácido gálico ($21,53 \text{ mg g}^{-1}$). A catequina foi a substância em menor concentração neste extrato ($8,16 \text{ mg g}^{-1}$). Considerando-se a infusão, observa-se uma maior extração de ácido cafeico ($33,15 \text{ mg g}^{-1}$), seguido por ácido clorogênico ($28,21 \text{ mg g}^{-1}$) e epicatequina ($20,71 \text{ mg g}^{-1}$).

Tabela 5. Concentração de polifenóis, flavonóides e taninos (mg g^{-1}) encontrados no extrato metanólico e na infusão de folhas secas de capim-annoni. ¹Fenóis: expresso em ácido gálico (mg g^{-1} da amostra); ²Flavonóides: expresso em quercetina (mg g^{-1} da amostra); ³Taninos: expresso em catequina (mg g^{-1} da amostra).

<i>Eragrostis plana</i>	Fenóis ¹ ± DP	Flavonóides ² ± DP	Taninos ± DP
Extrato metanólico	235,7 ± 0,18	91,6 ± 0,05	59,4 ± 0,02
Infusão	109,3 ± 0,11	46,2 ± 0,17	5,37 ± 0,13

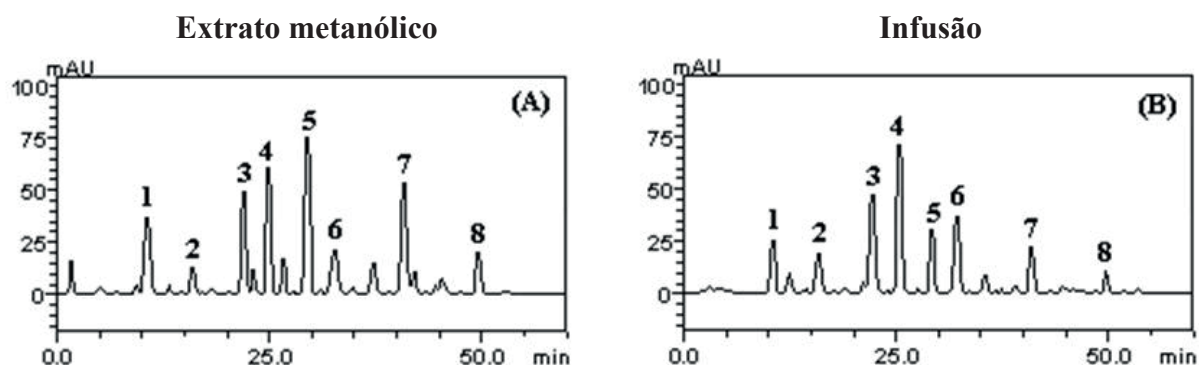


Fig. 1. Perfil cromatográfico representativo de capim-annoni extrato metanólico (A) e infusão (B), a detecção UV foi a 327nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácidocafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7) e quercetina (pico 8).

Tabela 6. Compostos presentes em extrato metanólico e infusão de folhas secas de capim-annoni pertencentes a fenóis, flavonóides e taninos. Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Compostos	Extrato metanólico		Infusão	
	mg g^{-1}	%	mg g^{-1}	%
Fenóis				
Ácido gálico	21,53 ± 0,01 c	2,15	17,56 ± 0,03 c	1,75
Ácido elágico	34,05 ± 0,03 f	3,40	19,07 ± 0,03 d	1,90
Ácido cafeico	31,17 ± 0,03 e	3,11	33,15 ± 0,03 f	3,31
Ácido clorogênico	29,30 ± 0,01 d	2,93	28,21 ± 0,02 e	2,82
Total:	116,05	11,59	97,99	9,78
Flavonóides				
Quercetina	15,32 ± 0,02 b	1,53	7,42 ± 0,01 a	0,74
Rutina	29,84 ± 0,01 d	2,98	16,93 ± 0,02 c	1,69
Total:	45,16	4,51	24,35	2,43
Taninos				
Epicatequina	16,83 ± 0,01 b	1,68	20,71 ± 0,01 d	2,07
Catequina	8,16 ± 0,02 a	0,81	14,83 ± 0,01 b	1,48
Total:	24,99	2,49	35,54	3,55

O ácido gálico é descrito como um importante redutor da germinação de um grande número de plantas (Moraes *et al.* 2010). Para Oliveira *et al.* (2012) o ácido elágico e o ácido gálico presentes nos extratos das folhas e cascas de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.), são considerados possíveis componentes alelopáticos sobre o desenvolvimento de plântulas de alface, onde a partir desses compostos foi evidenciando o aparecimento de plântulas anormais e redução do comprimento da parte aérea e da raiz.

Souza Filho *et al.* (2006) mostram que o efeito do potencial alelopático do ácido gálico sobre a germinação de sementes da planta daninha malícia (*Mimosa pudica*), tem efeito significativo na germinação, com 71 % de inibição. Já Loffredo *et al.* (2005) citam que o ácido cafeico tem efeito alelopático e inibe a germinação e crescimento de sementes de tomate. Ainda, Golisz *et al.* (2007), relatam que a rutina tem uma alta atividade alelopática sobre raízes de alface. Souto *et al.* (1994) verificaram que restos de *Pinus radiata* D. Don e de *Eucalyptus globulus* Labill. inibiram o crescimento e o desenvolvimento de alface e esse efeito alelopático deu-se principalmente por compostos fenólicos.

Alguns estudos descrevem que a presença de compostos fenólicos está diretamente relacionada com a atividade alelopática, a qual pode inibir o crescimento e até mesmo a germinação de outras espécies pertencentes ao mesmo ambiente. Portanto, o mesmo fenômeno pode estar ocorrendo com o capim-annoni, potencializando seu caráter de planta dominante e invasora.

Segundo Simões & Spitzer (1999), efeitos alelopáticos têm sido registrados para terpenos voláteis de *Eucalyptus globulus* e de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Atualmente, considera-se que existam funções ecológicas para os óleos voláteis, especialmente como inibidores de germinação.

Segundo Piña-Rodrigues & Lopes (2001) e Goetze & Thomé (2004) afirmam que é comum encontrar nas plantas superiores, compostos com propriedades alelopáticas diversificadas quimicamente, sendo que a quantidade e a composição destes podem variar de acordo com a espécie estudada.

O presente estudo demonstra que o extrato de capim-annoni apresentou efeito alelopático reduzindo e/ou inibindo a germinação de sementes, o índice de velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas em todas as espécies testadas e, possivelmente, este efeito deve-se a presença de compostos fenólicos e flavonóides.

REFERÊNCIAS

- Aquila, M.E.A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St. -Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Iheringia. Série Botânica 53(23):51-66.
- Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovik, V., Rocha, J.B.T. & Athayde, M.L. 2009. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. Bioresource Technology 100(1):6592-6598.
- Borella, J., Tur, C.M. & Pastorini, L.H. 2010. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica* sobre a germinação e crescimento inicial do rabanete. Revista Biociências 16(2):93-101.
- Borges, C.S., Cuchiara, C.C., Silva, S.D.A & Bobrowski, V.L. 2011. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária 5(3):15-20.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Secretaria da Defesa Agropecuária/coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Brasília, 399 p.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L. & Takaki, M. 2007. Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.)) Rohwer aqueous extracts. Acta Botanica Brasílica 21(1):697-705.
- Chiapusio, G., Sánchez, A.M., Reigosa, M.J., González, L. & Pellissier, F. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? Journal of Chemical Ecology 23(1):2445-2453.
- De Conti, D. & Franco, E.T.H. 2011. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* Sw. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Agrociência 17(2-4):193-203.
- Evaristo, I.M. & Leitão, M.C. 2001. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. Silva. Lusitana 9(2):135-141.
- Ferreira, A.G. & Áquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12 (Edição Especial):175-204.
- Ferreira, A.G. & Borguetti, F. 2004. Germinação do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, 323 p.
- Ferreira, N.R., Medeiros, R.B. & Soares, G.L.G. 2008. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. Revista Brasileira de Sementes 30(2):43-59.
- Feuchr, W., Treutter, D. & Christ, E. 1994. Accumulation of flavonols in yellowing beech leaves from forest decline sites. Tree Physiology 14(1):403-412.
- Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta Botanica Brasílica 18(3):459-472.
- Goetze, M. & Thomé, G.C.H. 2004. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. Revista Brasileira de Agrociência 10(1):43-50.
- Golisz, A., Lata, B., Gawronski, S.W. & Fujii, Y. 2007. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. Weed Biology and Management 7(1):164-171.
- Gomes, F.M., Fortes, A.M.T., Silva, J., Bonamigo, T. & Pinto, T.T. 2013. Efeito alelopático da fitomassa de *Lupinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). Revista Brasileira de Agroecologia 8(1):48-56.
- Hagemann, T.R., Benin, G., Lemes, C., Marchese, J.A., Martin, T.N., Pagliosa, E.S. & Beche, E. 2010. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. Bragantia 69(3):509-518.
- Harborne, J.B. 1997. Recent advances in chemecology. Natural Product Reports Articles 14(1):83-98.
- Hoffmann, C.E.F., Neves, L.A.S., Bastos, C.F. & Wallau, G.L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Revista de Ciências Agroveterinárias 6(1):11-21.
- Kamdern, J.P., Stefanello, S.T., Boligon, A.A., Wagner, C., Kade, I.J., Pereira, R.P., Preste, A.S., Roos, D.H., Waczuk, E.P., Appel, A.S., Athayde, M.L., Souza, D.O. & Rocha, J.B.T. 2012. *In vitro* antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. Acta Pharmaceutica 62(1):371-382.
- Kirkman, K.P. & Morris, C.D. 2003. Ecology and dynamics of *Eragrostis curvula* and *E. plana* with to controlling their spread in natural grassland. In VII International Rangeland Congress, Durban, South Africa, 138 p.
- Labouriau, L.G. & Valadares, M.B. 1976. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 48(2):263-184.
- Loffredo, E., Monaci, L. & Senesi, N. 2005. Humic substances can modulate the allelopathic potential of caffeic, ferulic, and salicylic acids for

- seedlings of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(24):9424-9430.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection evaluation for seedling emergence and vigour. Crop Science 2(1):176-177.
- Mauli, M.M., Fortes, A.M.T., Rosa, D.M.R., Piccolo, G., Marques, D.S., Corsato, J.M. & Leszczynski, R. 2009. Alelopatia de Leucena sobre soja e plantas invasoras. Semina: Ciências Agrárias 30(1):55-62.
- Medeiros, R.B., Pillar, V.P. & Reis, J.C.L. 2004. Expansão de *Eragrostis plana* Ness (capim-annoni-2) no Rio Grande do Sul. In Anais Reunión Del Grupo Técnico Regional Del Cono Sur En Mejoramiento y Utilización de Los Recursos Forrajeros Del Área Tropical y Subtropical, Uruguai, Salto, p.211-21.
- Moraes, P.V.D., Panozzo, L.E., Brandolt, R.R. & Silva, M.B.V. 2010. Potencial alelopático de extratos aquosos de mourisco (*Fogopyrum esculentum* Moench) na germinação e crescimento inicial de plantas daninhas. Revista Tropic-Ciências Agrárias e Biológicas 4(3):10.
- Morrison, M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. & Powell, A.A. 1995. Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. Annals of Botany 76(1):287-290.
- Oliveira, A.K., Coelho, M.F.B., Maia, S.S.S.M. & Diógenes, F.E.P. 2012. Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferreana* germinação de alface. Ciência Rural 42(8):1397-1403.
- Piña-Rodrigues, F.C.M. & Lopes, B.M. 2001. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. Floresta e Ambiente 8(1):130-136.
- Reis, J.C.L. 1993. Capim Annoni-2: origem, morfologia, características, disseminação. In Reunião Regional de Avaliação de Pesquisa com Annoni-2. Bagé, p.5-53.
- Reis, J.C.L. & Coelho, R.W. 2000. Controle do capim-annoni-2 em campos naturais e pastagens. Embrapa, Pelotas, 21 p.
- Rezende, C.P., Pinto, J.C., Evangelista, A.R. & Santos, I.P.A. 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. Boletim Agropecuário, Universidade Federal de Lavras 1(54):1-55.
- Rigon, C.A.G., Salomoni, A.T., Cutti, L. & Aguiar, A.C.M. 2013. Potencial alelopático de extratos de mamoneira sobre a germinação e crescimento de azevém. Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária 7(2):1-7.
- Rosa, D.M., Fortes, A.M.T., Palma, D., Marques, D.S., Corsato, J.M., Leszczynski, R. & Mauli, M.M. 2007. Efeito dos extratos de tabaco, leucena e sabugueiro sobre a germinação de *Panicum maximum* Jacq. Revista Brasileira de Biociências 5(2):444-446.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V. 1999. Óleos voláteis. In Simões, C.M.O., Schenkel, E.P. & Gosmann, G. Farmacognosia. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Porto Alegre/Florianópolis, p.387-416.
- Shirley, B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway. Trends in Plant Science 31(1):377-382.
- Souto, X.C., Gonzalez, L. & Reigosa, M.J. 1994. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (NW. Spain). Journal of Chemical Ecology 20(11):3005-3015.
- Souza Filho, A.P.S., Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhon, G.M.P., Santos, A.S., Arruda, M.S.P., Muller, A.H. & Arruda, A.C. 2006. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. Planta Daninha 24(4):649-656.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre, 918 p.
- Waller, G.R., Jurzysta, M. & Thorne, R.L.A. 1999. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat. Botanical Bulletin of Academia Sinica 34(1):1-11.
- Woisky, R.G. & Salatino, A. 1998. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research 37(1):99-105.
- Zucker, W.V. 1983. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. The American Naturalist 121(3):335-365.