

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Taninos e flavonoides em *Lotus* spp.

Sílvia Ortiz Chini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2013

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Taninos e flavonoides em *Lotus spp.*

SÍLVIA ORTIZ CHINI

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Meredith Scheffer Basso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2013

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

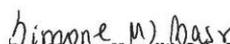
“Taninos e flavonoides em *Lotus* sp.”

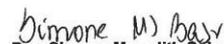
Elaborada por

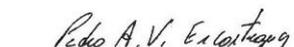
Silvia Ortiz Chini

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Produção Vegetal

Aprovada em: 05/04/2013
Pela Comissão Examinadora

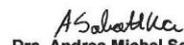

Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. Pedro Alexandre Varella Escosteguy
Coorientador
FAMV/UPF


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Grace Gosmann
UFRGS


Dra. Andrea Michel Sobottka
ICB/UPF

CIP – Catalogação na Publicação

- C539t Chini, Sílvia Ortiz
Taninos e flavonoides em Lotus spp. / Sílvia Ortiz
Chini. – 2013.
133 f. : il., color. ; 25 cm.
- Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2013.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Meredith Scheffer
Basso.
1. Nutrição animal. 2. Pastagens - Qualidade. 3. Solos
ácidos. I. Scheffer-Basso, Simone Meredith, orientadora.
II. Título.

CDU: 636.084

Catalogação: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/857

BIOGRAFIA DO AUTOR

Sílvia Ortiz Chini, nascida aos 29 dias do mês de agosto de 1986, em Soledade, Rio Grande do Sul, iniciou seus estudos na Universidade de Passo Fundo, em 2005. Em 2010 concluiu o Curso de Ciências Biológicas na mesma instituição. Em 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo – RS, realizando estudos sobre taninos e flavonoides em *Lotus* spp., para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Seu trabalho caracterizou-se pela multidisciplinaridade e pela utilização de técnicas inovadoras de quantificação e qualificação de substâncias químicas em leguminosas forrageiras, envolvendo as áreas de farmacognosia, controle de qualidade e nutrição animal.

Dedico

Aos meus amados pais, César e Denise, com todo amor que se possa ter.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil.

Meu maior agradecimento é dirigido à minha família, por ter tido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Agradeço de forma muito carinhosa aos meus pais e ao meu namorado Guilherme Rubin, pela paciência infinita e a crença absoluta na capacidade de realização, e foram, sem dúvida os elementos propulsores desta dissertação.

À excelência profissional da minha orientadora Prof.^a Dr.^a Simone Meredith Scheffer Basso que conferiu prestígio e valor ao trabalho de mestrado. Agradeço à professora a consideração de ter aceitado a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Agradeço ao Prof^o Dr. Pedro Escosteguy pela coorientação e à Prof^o Dr.^a Andréa Sobottka ao apoio e colaboração.

Meus agradecimentos, de forma especial, a Prof^a Ms.Charise Bertol, que foi meu braço direito na execução do trabalho, que dedicou seu precioso tempo em meu favor, auxiliando, orientando. Levo-te como um exemplo de colega e profissional.

Agradeço à Prof. Dr.^a Cercí Maria Carneiro, por guiar meus primeiros passos na vida acadêmica, por todos ensinamentos e por me abrir as portas do Laboratório Multidisciplinar Vegetal (MULTIVEG), para que eu fizesse parte desta família.

Agradeço à Adriana Favaretto e Jossana Santos por todo apoio prestado. Foi sorte terem cruzado meu caminho acadêmico e feito meus dias mais felizes para se viver. Obrigada pela amizade, carinho e confiança.

Aos meus amigos e colegas que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão. A todos vocês agradeço por me fazerem enxergar que acima da persistência, trabalho e dedicação está a amizade entre as pessoas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela aprovação do projeto 479283/2011-7 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs), pela aprovação do projeto 1014579.

Por fim agradeço a Deus pelo que conquistei até agora, por todas as coisas que vivo e que vivi neste período.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Metabolismo secundário.....	19
2.1.1 Compostos fenólicos.....	21
2.1.2 Taninos.....	22
2.1.2.1 Generalidades.....	22
2.1.2.2 Taninos condensados.....	24
2.1.2.3 Taninos hidrolisáveis.....	25
2.1.2.4 Atividades farmacológicas e biológicas.....	27
2.1.2.5 Métodos de análise.....	29
2.1.2.5 Taninos em plantas forrageiras.....	30
2.1.3 Flavonoides.....	32
2.1.3.1 Generalidades.....	32
2.1.3.2 Flavonoides em leguminosas forrageiras.....	33
2.2 Acidez do solo.....	35
2.2.1 Generalidades.....	35
2.2.2 Toxidez de alumínio às plantas.....	36
2.2.3 Efeito em pastagens naturais.....	39
2.2.4 Medidas preventivas e corretivas.....	40
2.2.5 Mecanismos de tolerância ao alumínio.....	43
2.3 O gênero <i>Lotus</i> L.....	45
2.3.1 Generalidades.....	45
2.3.2 Taninos condensados em <i>Lotus</i>	47
2.3.3 <i>Lotus corniculatus</i>	49
2.3.4 <i>Lotus uliginosus</i>	52
2.3.5 <i>Lotus subbiflorus</i>	55
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Material vegetal.....	57
3.1.1 Ensaio I – Taninos e flavonoides em <i>Lotus</i> spp. sob distintos níveis de acidez do solo.....	57
3.1.2 Ensaio II – Taninos e flavonoides de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel presente em área ruderal.....	62
3.2 Análises farmacognósticas.....	66
3.3 Análise Estatística.....	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de taninos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência.....	75

4.2 Aplicação da metodologia desenvolvida nos extratos vegetais.....	88
4.2.1 Taninos e flavonoides em <i>Lotus</i> spp. em função da acidez do solo.....	88
4.2.2 Taninos condensados e flavonoides de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel presente em área ruderal.....	106
5 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICES.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Atributos físico-químicos de um Latossolo Vermelho escuro distrófico tratado com calcário e fertilizantes contendo fósforo e potássio após três meses de incubação.....	61
2	Atributos físico-químicos de um Latossolo Vermelho escuro distrófico tratado com calcário e fertilizantes contendo fósforo e potássio ao final do experimento.....	63
3	Produção de matéria seca da parte aérea de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados em solo com calcário, obtida em quatro cortes.....	66
4	Produção de matéria seca da parte aérea de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados em solo sem calcário, obtida em quatro cortes.....	67
5	Equações lineares e coeficientes de correlação das substâncias químicas de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol...	83
6	Limites de detecção e quantificação dos métodos para cada substância química de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol.....	85
7	Estudos de exatidão das substâncias químicas de referência (SQR), catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol em soluções-padrão.....	86
8	Repetibilidade e precisão em soluções-padrão das substâncias químicas de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol...	87
9	Concentração de taninos condensados, expressa em equivalente catequina e epicatequina (ECE), na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	90
10	Concentração de catequina e epicatequina na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	97
11	Contribuição percentual de catequina e epicatequina na formação dos taninos condensados totais (TC) na matéria	

	seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	101
12	Concentração de flavonoides (rutina e quercetina) na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	104
13	Teores médios (\pm desvio padrão) de catequina, epicatequina, taninos condensados totais, rutina e quercetina de distintas frações de plantas de cornichão cv. São Gabriel colhidas em estágio vegetativo e reprodutivo.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Temperaturas médias ocorridas no período experimental e normais regionais. Fonte: Embrapa Trigo. http://www.cnpt.embrapa.br	58
2	Vista geral do local do ensaio. Passo Fundo, RS. 2012.....	59
3	Área de coleta de plantas de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel em estágio vegetativo no campus I da Universidade de Passo Fundo.....	63
4	Área de coleta de plantas de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel em estágio reprodutivo no campus I da Universidade de Passo Fundo.....	64
5	Material vegetal de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel coletado em florescimento pleno (29/11/2011).....	65
6	Separação dos componentes das plantas de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel coletadas no campus I da Universidade de Passo Fundo.....	65
7	Estruturas vegetativas e reprodutivas de plantas de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel.....	66
8	Preparação dos extratos de genótipos de <i>Lotus</i> spp. em balões volumétricos.....	72
9	Extratos obtidos de genótipos <i>Lotus</i> spp.....	73
10	Fluxograma do procedimento experimental para análise de taninos e flavonoides por CLAE em <i>Lotus</i> spp.....	74
11	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de rutina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; e 25,0 µg/mL).....	76
12	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de catequina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (25,0; 35,0; 45,0; 55,0 e 65,0 µg/mL).....	77
13	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de epicatequina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (25,0; 35,0; 45,0; 55,0; e 65,0 µg/mL)..	77
14	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de quercetina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; e 25,0 µg/mL)....	78
15	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de ácido gálico em metanol em concentrações pré-estabelecidas (10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL).....	78

16	Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de solução de canferol em metanol em concentração pré-estabelecida (20,0 µg/mL).....	79
17	Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila: água (18:82 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de catequina, epicatequina e rutina (40µg/mL).....	80
18	Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila:água (45:55 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de quercetina (40,0 µg/mL).....	81
19	Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila:água (10:90 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de ácido gálico (200,0 µg/mL).....	81
20	Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila: solução A (30:70, v/v), pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção UV em 260 nm de canferol (100,0 µg/mL).....	81
21	Curva de calibração média (n=5) da rutina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
22	Curva de calibração média (n=5) da quercetina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
23	Curva de calibração média (n=5) da catequina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
24	Curva de calibração média (n=5) da epicatequina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
25	Curva de calibração média (n=5) do ácido gálico obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
26	Variação (V) na concentração de catequina e epicatequina na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	98
27	Razão entre concentrações de epicatequina e catequina na parte aérea (folha+caule) de genótipos de <i>Lotus</i> spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.....	102

TANINOS E FLAVONOIDES EM *LOTUS* spp.

Sílvia Ortiz Chini¹

Resumo – Este trabalho teve como objetivo quantificar a concentração de taninos condensados (TC) e flavonoides em *Lotus* spp. em resposta à acidez do solo e em relação aos componentes morfológicos de plantas colhidas em distintos estádios fenológicos. O trabalho constou de dois ensaios: no Ensaio I foram quantificadas as concentrações de taninos e flavonoides de duas cultivares (cv. São Gabriel e cv. Ganador) e da população UFRGS de *L. corniculatus*, uma cultivar de *L. uliginosus* (cv. Serrano) e uma cultivar de *L. subbiflorus* (cv. El Rincón), cultivadas em vasos, sob duas condições de acidez do solo (pH= 4,7; pH= 6,4). No Ensaio II, plantas da cv. São Gabriel foram coletadas nos estádios vegetativo e reprodutivo e avaliadas quanto à concentração taninos condensados e flavonoides nas frações “folha+caule” e “flor+fruto”. Em ambos os ensaios o material vegetal foi submetido à extração hidroalcoólica. Para identificação e quantificação de taninos e flavonoides, foram desenvolvidos e validados métodos de separação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando catequina, epicatequina, ácido gálico, rutina, quercetina e canferol como padrões de referência. Houve efeito da interação genótipo x acidez do solo para concentração de taninos condensados e flavonoides,

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção Vegetal.

evidenciando a variabilidade intra e interespecífica no gênero *Lotus* L. A maior amplitude de variação de taninos condensados foi verificada em solo ácido, de 5,6 g TC/kg MS (cv. Serrano) a 23,1 g TC/kg MS (população UFRGS). Em solo com pH 6,4, obteve-se entre 2,3 g TC/kg MS (cv. El Rincón) e 7,5 g TC/kg MS (Ganador). No estágio reprodutivo, as concentrações de taninos condensados e flavonoides na fração “folha+caule” foram superiores (média= 16,3 g/kg) ao que se verificou no estágio vegetativo (média= 10,0 g/kg) A fração “flor+fruto” apresentou 120% mais rutina, 333% vezes mais quercetina, 76% mais epicatequina e 47% mais taninos condensados em relação à fração “folha+caule”. Os resultados do estudo indicam a importância da avaliação de taninos condensados nos programas de melhoramento genético de *Lotus* spp. e da sua relação com o estágio fenológico e acidez do solo.

Palavras- chave: acidez, catequina, epicatequina, fenologia, quercetina, proantocianidinas, rutina.

TANNINS AND FLAVONOIDS IN *LOTUS* spp.

Abstract – The present study aimed to quantify the content of condensed tannins (CT) and flavonoids in *Lotus* spp. in response to soil acidity and the relationship to morphological components of the plants harvested in different phenological stages. Two experiments were performed: in the Experiment I, the concentration of tannins and flavonoids of *L. corniculatus* (cv. São Gabriel, cv. Ganador and population UFRGS), *L. uliginosus* (cv. Serrano) and *L. subbiflorus*

(cv. El Rincón), grown in pots, under two soil pH (4.7 to 6.4), was determined. In Experiment II, the components “leaf+stem” and “flower+fruit” of cv. São Gabriel plants harvested in vegetative and reproductive stages were evaluated as for tannins and flavonoids. In both experiments, the plant material was subjected to extraction hydroalcoholic. For identification and quantification of the tannins and flavonoids, methods for separation and quantification by High Performance Liquid Chromatography were developed and validated, using catechin, epicatechin, gallic acid, rutin, quercetin and kaempferol as reference standards. There was a significant interaction between genotype and soil acidity, showing intraspecific and interspecific variability. The largest variation of condensed tannins was observed in acid soil, from 5.6 g CT/kg DM (cv. Serrano) to 23.1 g CT/kg DM (population UFRGS). In soil with pH 6.4 the concentration varied from 2.3 g CT/kg DM (cv. El Rincón) to 7.5 g CT/kg DM (cv. Ganador). At the reproductive stage, the concentrations of condensed tannins and flavonoids in leaf+stem were higher (16.3 g/kg) than that found in the vegetative stage (10.0 g/kg). The component flower+fruit showed 120% more rutin, 333% more quercetin, 76% more epicatechin and 47% more CT compared to leaf+stem. The results of the study indicate the importance of the evaluation of these metabolites in breeding programs of *Lotus* spp. and the relationship of these compounds with the phenological stage of the plants and the soil acidity.

Keywords: acidity, catechin, epicatechin, phenology, proanthocyanidins, quercetin, rutin.

1 Introdução

Concentrações de taninos em leguminosas que não sejam limitantes ao consumo, mas sejam suficientes para evitar o timpanismo em ruminantes é um aspecto a ser considerado em melhoramento vegetal, na escolha de cultivares e no manejo destas. Contudo, a concentração de taninos em leguminosas varia com fatores genéticos, edáficos ou fenológicos (ANURAGA et al., 1993; ROBERTS et al., 1993; KRAUS et al., 2004; ESCARAY et al., 2007). O conhecimento da interrelação destes fatores é, então, importante para o manejo do cultivo destas espécies, como as do gênero *Lotus*, pois possibilitará melhorar a concentração de taninos e, conseqüentemente, o potencial forrageiro.

Flavonoides também são encontrados em leguminosas, agindo como agentes antimicrobianos, antioxidantes e como sinalizadores químicos na fixação simbiótica de N. Além disso, essas substâncias possuem interessantes atividades biológicas em humanos (AOKI et al., 2000) e despertam interesse econômico por contribuírem para o sabor dos alimentos e por possuírem uma pigmentação característica (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Em trabalho realizado na Universidade de Passo Fundo, por Moro et al. (2010), foram verificadas baixas concentrações de taninos em espécies de *Lotus* L., aquém do esperado. No entanto, na presença de polietilenoglicol ocorreu maior produção de gases, na medida em que aumentou a concentração de TC, aumentou o incremento de gases, indicando que, mesmo em pequena quantidade,

os TC foram determinantes em reduzir a fermentação ruminal *in vitro*.

Uma das possíveis causas para as baixas concentrações de taninos obtidas no estudo de Moro et al. (2010) é ausência de restrição ao crescimento das plantas, nas condições experimentais utilizadas por estes autores. No trabalho de Moro et al. (2010), as plantas foram cultivadas sem estresse hídrico, térmico e nutricional, o que pode ter reduzido a síntese de metabólitos secundários, como os flavonoides. No trabalho, foram investigadas possíveis relações entre taninos e flavonoides e a acidez potencial do solo, a fenologia e os componentes das plantas de *Lotus* spp..

A acidez do solo foi escolhida como um dos fatores a ser estudado, pois a maior parte das pastagens naturais do sul do Brasil encontra-se em regiões de solos ácidos, com elevada saturação por alumínio (Al) (SANTOS et al., 2001; SOUZA et al., 2007; RAIJ, 2011). Além disso, as espécies de *Lotus* L. se destacam entre as leguminosas temperadas tolerantes a essa condição edáfica (JANKE et al., 2010).

A concentração de TC se altera consideravelmente dependendo da espécie, cultivar, estágio de desenvolvimento e fertilidade do solo (GEBREHIWOT et al., 2002). Com o âmbito de esclarecer a produção de taninos e flavonoides de *Lotus* frente a ciclos de desenvolvimento, plantas em distintas fases fenológicas e seus distintos componentes foram analisados.

O trabalho teve como objetivo geral investigar o perfil fitoquímico de *Lotus* spp., com ênfase em taninos e flavonoides. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Avaliar o efeito da acidez do solo, dos estádios fenológicos e dos componentes vegetativos e reprodutivos das plantas no teor de taninos e de flavonoides em extratos hidroalcoólicos de *Lotus* spp. por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- Desenvolver, otimizar e validar um método por CLAE, para determinação simultânea de flavonoides e taninos;
- Identificar em extratos de *Lotus* spp., mediante comparação com substâncias químicas de referência, os compostos quercetina, rutina, canferol, catequina, epicatequina e ácido gálico.

2 Revisão de literatura

2.1 Metabolismo secundário

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (PERES, 2004). Ao metabolismo que é capaz de produzir, sintetizar e transformar substâncias que não estão relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, dá-se o nome de metabolismo secundário, cujos produtos não são essenciais, mas garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (SANTOS, 2004). Metabólitos secundários são compostos orgânicos não envolvidos nos processos metabólicos primários, mas que possuem um grande efeito na ecologia e evolução das espécies (METLEN et al., 2009).

Por muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados resíduos de excreção vegetal e a sua importância adaptativa era desconhecida. Hoje, estas substâncias estão diretamente envolvidas a mecanismos que permitem às plantas adequação ao habitat e proteção frente à predação, herbivoria, infecção por micro-organismos, atração de polinizadores ou de animais dispersores de sementes e alelopatia (TAIZ & ZEIGER, 2004). Além disso, estes metabólitos atuam protegendo os vegetais de estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, de conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004). São importantes

compostos terapêuticos e para uso comercial em áreas como farmacêutica, alimentar, cosmética e agronômica (SANTOS, 2004).

Rotas metabólicas secundárias são ativadas em algum estágio de desenvolvimento da planta ou em algum período que a planta é submetida a algum tipo de estresse pela deficiência de nutrientes ou ataque por micro-organismos. A produção destas substâncias é resultante de uma complexa biossíntese, transporte, estocagem e degradação, e está diretamente relacionada à hereditariedade, ontogenia e ambiente (GARCÍA, 2004).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados compartimentalizados em vacúolos (hidrofilicos) ou em ductos celulares, ligados a membranas, ceras e lignina, acumulados por toda a planta ou em alguns órgãos. Possuem sua origem em reações análogas às do metabolismo primário do carbono sendo mediada por dois principais intermediários: ácido chiquímico e acetato. Também podem se originar da combinação destes dois compostos ou de unidades deles. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, que são os precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como alcaloides indólicos, fenilpropanoides e taninos hidrolisáveis. A combinação de ácido chiquímico e unidades de acetato dão origem às antraquinonas, flavonoides e TC. Os derivados restritos da rota do acetato possuem três vias de formação: via do ácido cítrico (alcaloides); via mevalonato (terpenoides e esteróis) e via condensação do acetato (ácidos graxos e acetogeninas) (SANTOS, 2004). A partir das distinções químicas, estes produtos secundários podem ser divididos em terpenos,

compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2004).

2.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se por apresentar em sua estrutura química um grupo hidroxila funcional em um anel benzênico (fenol), e diferenciam-se pela heterogeneidade de aproximadamente dez mil compostos. Constituem um dos grupos de compostos mais abundantes nas plantas. São considerados como uma das principais classes de metabólitos secundários com funções variadas nas plantas que vão desde a pigmentação ao crescimento (CARVALHO et al., 2004). Os polifenóis estão presentes em todas as plantas forrageiras, especialmente em pastagens perenes, sendo os principais compostos que contribuem para a capacidade antioxidante da forragem (HARAMANESCU, 2011).

A síntese dos compostos fenólicos possui duas rotas básicas de origem: a do ácido chiquímico (em plantas) e a do acetato via mevalonato (em fungos e bactérias). Nas plantas superiores a maioria dos fenóis é derivada da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico. Nestes compostos fenólicos originários da fenilalanina estão: fenilpropanóides, cumarinas, derivados do ácido benzóico, antocianinas, ligninas, isoflavonas e TC (CARVALHO et al., 2004).

Compostos fenólicos em vegetais têm reconhecidas funções que vão desde defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atração de polinizadores e dispersores, proteção contra a radiação ultravioleta à alelopatia. Além da proteção contra diversos

fatores ambientais e bióticos acredita-se que tenham sido fundamentais para a evolução das plantas e conquista do ambiente terrestre. Esse é o caso da lignina, a qual proporciona o desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos. De modo coerente com essa hipótese, plantas primitivas, que habitam, principalmente, ambientes úmidos, como briófitas e pteridófitas, são pobres em compostos fenólicos (PERES, 2004).

2.1.2 Taninos

2.1.2.1 Generalidades

Inclusa nos produtos naturais fenólicos há uma classe denominada “taninos”, que possuem o maior peso molecular dentre os compostos fenólicos. Em quantidades e em condições normais nas plantas, os fenóis comuns não são considerados tóxicos, com exceção dos taninos (SILVA & SILVA, 1999). Bate-Smith & Swain (1962) fizeram a primeira definição de tanino como compostos polifenólicos solúveis em água com pesos moleculares variando de 500 a cerca de 3000 Daltons, que possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com macromoléculas como proteínas, gelatinas e alcalóides. Os taninos apresentam complexidade variada. Não são quimicamente bem definidos, mas são considerados substâncias polifenólicas do metabolismo secundário com habilidade de complexar e precipitar proteínas em meio aquoso (MAKKAR, 2003b).

A etimologia da palavra “tanino” está ligada ao princípio adstringente causado pela infusão da casca da castanha-portuguesa

(*Castanea sativa* L., Fagaceae) e dos carvalhos (*Quercus* sp., Fagaceae) sobre a pele dos animais. Este processo ficou conhecido a partir do ano de 1796 e tornava a pele imputrescível, produzindo o couro (BRUNETON, 2001; COSTA, 2002).

Os efeitos biológicos de taninos geralmente dependem do seu grau de polimerização e solubilidade. Taninos altamente polimerizados apresentam baixa biodisponibilidade (SERRANO et al., 2009). Acredita-se que os taninos podem exercer as suas propriedades biológicas de três modos diferentes: (i) após a complexação com íons metálicos; (ii) atuando como antioxidantes, ou (iii) através da sua capacidade para complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas, como proteínas e polissacáridos (HASLAM, 1996).

A estabilidade proporcionada às proteínas pelos taninos deve-se ao fato de que um mol de taninos pode se ligar a doze moles de proteínas. Para a formação destas ligações, é necessário que o peso molecular do tanino esteja compreendido entre limites bem definidos. Se o peso molecular do polifenol é demasiadamente elevado, ele não consegue se intercalar entre as moléculas protéicas; se for muito baixo os taninos se intercalam, mas não conseguem estabelecer ligações suficientes para assegurar estabilidade à ligação (MONTEIRO et al., 2005). A complexação com proteínas e macromoléculas é o que explica, por exemplo, a característica adstringente do composto, que precipita as proteínas ricas em prolina contidas na saliva (BRUNETON, 2001).

Nos vegetais superiores, os taninos são divididos em duas classes segundo sua estrutura química e biogênese: TC e taninos hidrolisáveis.

2.1.2.2 Taninos condensados

Os TC, ou proantocianidinas são flavanóis poliméricos oriundos do metabolismo dos flavonoides, que quando aquecidos em meio ácido podem sofrer degradação oxidativa à antocianidina, conhecida como reação de Bate-Smith (BRUNETON, 2001; PIÑEDO, 2008). As unidades fundamentais das proantocianidinas estão geralmente ligadas entre si por ligações do tipo C-C entre o C4 de um flavan-3-ol e o C8 ou C6 do flavan-3-ol seguinte. O grau de polimerização pode variar, podendo-se encontrar oligômeros (dímeros a hexâmeros) e polímeros, que podem atingir graus de polimerização muito elevados (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004).

A presença ou não da hidroxila (OH), assim como sua localização na estrutura dos monômeros de flavan-3-ol resulta em diferentes classificações dos TC. Desta forma os TC podem ser divididos em tipo 1, aquele que apresenta uma hidroxila na posição C-5 do anel A e tipo 2, que não apresenta hidroxila na mesma posição (SANTOS & MELLO, 2004). Os TC também podem ser classificados de acordo com a presença de OH na posição C-3 do anel B em prodelfinidina ou na ausência desta OH em procianidina. Os monômeros de procianidinas são a catequina e a epicatequina enquanto os monômeros de prodelfinidina são a galocatequina e a epigalocatequina (BRUNET & HOSTE, 2006). Devido ao grau de hidroxilação dos anéis aromáticos e alteração na estereoquímica, os

monômeros básicos podem alterar suas denominações e conseqüentemente alterar suas características (SANTOS & MELLO, 2004). Segundo estes mesmos autores os monômeros básicos são: distenina, afzelequina, catequina, galocatequina, guibourtidinidol, fisetinidol, robinetinidol, oritina e mesquitol. Destaca-se que os cinco últimos monômeros citados estão presentes apenas em leguminosas.

Os TC são produtos finais da síntese de flavonoides e sua biossíntese é complexa e coordenada por vários genes. A regulação do processo possui genes envolvidos na via geral de flavonoides para antocianidinas, no controle de formação, transporte e polimerização de subunidades de TC e nos processos de desenvolvimento de células especializadas (vacúolos) que irão armazenar TC (DIXON et al., 2005).

Esses compostos constituem a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, distribuídos principalmente em plantas lenhosas, perdendo apenas para a lignina. São muito mais comuns na dieta do que os taninos hidrolisáveis e estão presentes em concentrações relativamente importantes em frutos (uvas, maçãs, framboesas) bebidas derivadas, no cacau e chocolate, entre outros (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004).

2.1.2.3 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são ésteres do ácido gálico e elágico glicosilados, oriundos do ácido chiquímico, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (MONTEIRO et al., 2005). São constituídos por uma parte polialcoólica (normalmente a glicose, mas também o ácido

chiquímico, outros fenóis e outros glicosídeos) e por uma parte fenólica (principalmente ácido gálico e elágico) ligados por uma ligação éster. Os taninos hidrolisáveis são passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem (BRUNETON, 2001; PIÑEDO, 2008). Tais substâncias podem ser classificadas, quanto a sua parte fenólica, em taninos gálicos (galotaninos), em que a parte fenólica é o ácido gálico, e taninos elágicos (elagitaninos), em que a parte fenólica além do ácido gálico é o ácido hexahidroxidifênico e que, após a hidrólise, origina ácido elágico (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004).

Esses compostos são abundantes nas magnoliopsidas (dicotiledôneas) e não são muito comuns em troncos de muitas árvores. No entanto, algumas árvores, como a castanheira-portuguesa e o carvalho são utilizadas como fontes industriais de taninos hidrolisáveis. Os taninos gálicos são extremamente raros na dieta humana e os taninos elágicos encontram-se apenas em grupos restritos de vegetais, como framboesa (*Rubus idaeus* L.), morango (*Fragaria vesca* L.), avelã (*Corylus avellana* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e pistache (*Pistacia vera* L.). Também pode-se encontrar taninos elágicos em vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho, como resultado da extração da madeira durante o seu estágio em barricas (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004).

2.1.2.4 Atividades farmacológicas e biológicas

A atividade dos taninos está associada às diferenças estruturais entre condensados e hidrolisáveis e são afetadas por elas. A principal característica está relacionada à complexação protéica pelos TC, o que não ocorre com os taninos hidrolisáveis *in vivo*. Os taninos hidrolisáveis são rapidamente degradados em grupos fenólicos menores e tornam-se incapazes de reacionar com as proteínas do meio (PIÑEDO, 2008).

Os TC se distribuem amplamente no reino vegetal especialmente em plantas lenhosas e leguminosas, enquanto que os hidrolisáveis estão praticamente restritos às magnolipsidas Choripetalae (ex: *Vitis vinifera* L.) herbáceas e lenhosas (SANTOS & MELLO, 2004). Nas plantas, a concentração de TC é primariamente controlada por fatores genéticos e secundariamente por variáveis ambientais. Geralmente a concentração destes metabólitos está associada à concentração de lignina do tecido e tende a aumentar com a maturidade da planta (ACUÑA et al., 2008). Segundo Nozella (2001), a quantidade e o tipo de tanino sintetizado pelas plantas variam consideravelmente, dependendo de espécie, cultivar, tecidos, estágio de desenvolvimento e condições ambientais.

Os principais fatores ambientais, que regulam o aumento da concentração de TC são a temperatura do ar e a fertilidade do solo (ACUÑA et al., 2008). Piñedo (2008) assinala que a maior concentração de taninos é encontrada em espécies que se desenvolvem em solos com baixa fertilidade. Acuña et al. (2008), trabalhando com concentrações de TC em *Lotus* spp., relataram que a

maior concentração foi verificada em plantas com o crescimento limitado por restrição hídrica e altas temperaturas.

A concentração de taninos é importante para a sua utilização farmacológica e biológica. Na farmacognosia, os taninos são conhecidos pela ação fungicida e bactericida, antiviral, antioxidante e antitumoral (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004). Os taninos possuem diversos efeitos sobre os sistemas biológicos, pois são potenciais quelantes de íons metálicos, agentes precipitantes de proteína e antioxidantes biológicos. Desta forma, desempenham papéis biológicos variados. Em consequência da enorme variabilidade de estruturas químicas possíveis dentro desta classe, é muito difícil a avaliação e previsão dos efeitos biológicos causados (HAGERMANN, 2002).

Na medicina tradicional, plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de várias moléstias. Na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações e sobre úlceras gástricas, os taninos agem formando uma camada protetora tecidual (complexo tanino-proteína) auxiliando na reestruturação epitelial e formação de vasos. Esta característica é conhecida como atividade terapêutica devido a sua adstringência. As concentrações intercelulares de radicais livres e moléculas reativas são as causadoras de muitas doenças degenerativas como o câncer, esclerose múltipla e o próprio envelhecimento. Neste caso, os taninos atuam como captadores de radicais bloqueando atividades enzimáticas, prevenindo e tratando estas doenças. A função bactericida, fungicida, e antiviral estão relacionadas à ligação das moléculas de taninos a outras substâncias que possibilitam, por exemplo, a degradação da membrana celular de

fungos e bactérias e o impedimento da adsorção e penetração viral (BRUNETON, 2001; SANTOS & MELLO, 2004).

O papel biológico dos taninos é fonte de várias investigações. Acredita-se que os taninos estejam envolvidos no sistema de defesa química das plantas contra uma ampla variedade de fungos, bactérias e leveduras. Eles auxiliam na adaptação a condições climáticas adversas e podem aumentar a resistência a insetos (GEBREHIWOT et al., 2002; SANTOS & MELLO, 2004). A planta produz altos níveis de fenóis quando passa por algum processo de cicatrização. Próximo ao ferimento os fenóis são oxidados a quinonas e a polímeros complexos conhecidos como fitomelanina marrom, que são frequentemente mais tóxicos aos invasores do que os fenóis (SILVA & SILVA, 1999).

2.1.2.5 Métodos de análise

Devido à grande variabilidade de estruturas, alta reatividade, oxidação e complexação com macromoléculas, o isolamento, identificação e quantificação de taninos é um processo muito complexo. Mesmo assim, os taninos vegetais vêm sendo quantificados por diversas técnicas de precipitação de proteínas ou métodos colorimétricos, sendo o último o mais utilizado. Dependendo do tipo de tanino a ser buscado podem-se selecionar diversos tipos de ensaios para a quantificação e determinação dos compostos. Em todos os testes químicos, colorimétricos ou de precipitação são conhecidas vantagens e desvantagens. Muitos são os fatores que interferem nas análises, fato este que deve ser verificado previamente. Fatores como temperatura do meio, tipo e data de coleta do material vegetal,

suscetibilidade de enzimas, proteínas, microrganismos, composição do meio de incubação, entre outros são passíveis de alterações significativas nos resultados a serem obtidos (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, as diferenças nos resultados podem estar relacionadas aos métodos de extração e/ou processamento das amostras antes da análise. Ocorre que na maioria dos trabalhos com plantas herbáceas é feita a análise de toda a parte aérea, sem a separação de folhas, caules e flores (NOZELLA, 2001).

Embora tenham sido propostas diferentes abordagens para análises de metabólitos secundários, a separação e quantificação destes nos extratos permanecem difíceis, especialmente a determinação simultânea de metabólitos em uma única análise. A CLAE é um dos métodos de escolha para a análise de flavonoides e taninos neste trabalho devido a sua versatilidade e precisão, além de ser uma ferramenta muito adequada para separação e quantificação (CHENG et al., 2007). Após o desenvolvimento de um método, é de fundamental importância que este seja validado de acordo com os parâmetros: especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, de acordo com a Resolução R.E. nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) e a norma Q2 (R1) (ICH, 2005).

2.1.2.6 Taninos em plantas forrageiras

Os TC estão presentes na fração de fibra alimentar de diferentes alimentos e podem ser considerados fatores antinutricionais para alimentação animal. Em leguminosas e cereais os taninos têm recebido considerável atenção, pelos efeitos adversos

na cor, sabor e qualidade nutricional. Leguminosas taníferas podem aumentar o nível de silagens, prevenindo a excessiva degradação das proteínas do alimento e aumentando a durabilidade (MAKKAR, 2003b). Por isso, a avaliação da presença e concentração de TC é um fator importante nos estudos de plantas forrageiras.

Em espécies forrageiras os TC podem ter efeitos negativos ou positivos no valor nutritivo dependendo da concentração em que se encontram. Altas concentrações (60-100 g/kg) reduzem o consumo voluntário pelos ruminantes, a palatabilidade, a eficiência digestiva e, conseqüentemente, há baixo desempenho produtivo dos animais. Altas concentrações também estão relacionadas com elevados níveis de lignina, proteína bruta e baixa digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS). Em moderadas e baixas concentrações (20-40 g/kg) seus efeitos em ruminantes são benéficos, prevenindo infecções e o timpanismo, aumentando a absorção protéica e a distribuição de nitrogênio dos aminoácidos essenciais (GEBREHIWOT et al., 2002; PIÑEDO, 2008).

No processo ruminal, os taninos hidrolisáveis são degradados por micro-organismos enquanto que os TC não. Isso ocorre devido a interação TC-proteínas fazendo com que estes complexos sejam insolúveis ao pH ruminal. Este processo protege as proteínas de degradação no rúmen, reduzindo a taxa de fermentação e prevenindo um processo conhecido como timpanismo. Pastagens com níveis de taninos moderados aumentam a absorção protéica no intestino delgado e abomaso. Isto se reflete no incremento da lactação, crescimento de lã em ovelhas, ganho de peso, e também promovendo a saúde animal contra efeitos de parasitas

gastrointestinais (GEBREWIHOT et al., 2002; MAKKAR, 2003a; PIÑEDO, 2008).

O conhecimento acerca do controle molecular na biossíntese de TC está aumentando rapidamente. Objetiva-se que a engenharia genética possibilite a expressão de níveis aumentados de TC nas folhas de plantas forrageiras importantes na agricultura como o trevo branco e o azevém perene, que são espécies capazes de suportar a desfolha sob pastejo contínuo. Isso poderia levar ao uso generalizado de TC em sistemas de pastagem de clima temperado (AERTS et al., 1999).

2.1.3 Flavonoides

2.1.3.1 Generalidades

Com mais de oito mil compostos, estes polifenóis são subdivididos em várias classes como flavonóis, flavonas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (MACHADO et al., 2008). A estrutura química dos flavonoides é baseada em 15 carbonos (C6-C3-C6), sendo que as duas extremidades de seis carbonos são anéis aromáticos (VOLP et al., 2008).

Os flavonoides são compostos derivados da via do ácido chiquímico a partir da atuação da enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL). A PAL é regulada por fatores ambientais, como o nível nutricional, luz (pelo efeito do fitocromo) e infecção por fungos. Os flavonoides estão envolvidos principalmente na sinalização química entre indivíduos (alelopatia, polinização) e na proteção contra radiação ultravioleta. Outra enzima importante também atua na

biossíntese de flavonoides é a chalcona-sintase (CHS) (PERES, 2004).

As propriedades farmacológicas ou biológicas dos flavonoides estão relacionadas com atividades antioxidantes, retardando ou inibindo a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando, assim, o início ou a propagação de reações de oxidação em cadeia (MACHADO et al., 2008). Desta forma, os flavonoides possuem múltiplos efeitos biológicos na saúde humana, como antiinflamatórios, vasodilatadores, antitumorais, antimicrobianos, antivirais, inibidores da agregação plaquetária e prevenção de doenças cardiovasculares (VOLP et al., 2008).

A capacidade antioxidante dos flavonoides, e, portanto, a sua via de degradação oxidativa, está ligada às suas características estruturais. A presença de oxigênio acelera a queda de rutina e quercetina. Por isso, sugere-se que esta associação seja resultante da capacidade antioxidante destes flavonoides (BUCHNER et al., 2006).

A grande diversidade estrutural destes compostos é explicada pelas modificações que estes podem sofrer a partir de hidroxilações, metilações, acilações, glicosilações, entre outras (LOPES et al., 2000). Modificações estruturais alteram as propriedades biológicas dos flavonoides (DIXON & STEELE, 1999).

2.1.3.2 Flavonoides em leguminosas forrageiras

As leguminosas são interessantes para estudos sobre flavonoides, por produzirem compostos com estruturas químicas e funções fisiológicas específicas (AOKI et al., 2000). Os flavonoides também desempenham papéis fundamentais na adaptação de

leguminosas aos seus ambientes biológicos, agindo tanto como compostos de defesa (fitoalexinas), quanto em sinais químicos na fixação simbiótica de nitrogênio. As leguminosas são uma fonte importante de alimentos e forragem e por isso os efeitos de flavonoides oriundos de leguminosas sobre a saúde humana e animal estão sendo estudados (DIXON & STEELE, 1999).

Alguns flavonoides e isoflavonoides têm sido usados como marcadores moleculares de leguminosas (GOMES et al., 1981). Como exemplo tem-se os compostos daidzeína, genisteína, formonetina e biochantina A, que são muito comuns no gênero *Trifolium* L. Em trabalho de Dettenborn (2009) foram encontradas isoflavonas do tipo formonetina e biochantina em serradela (*Ornithopus micranthus* (Benth.) Arechavaleta). Basualdo et al. (2003) identificaram canferol, quercetina e isoramnetina em populações de *Lotus glaber* Mill., sendo que a população oriunda de San Vicente, Argentina, não mostrou quercetina, mas apresentou as maiores concentrações de isoramnetina. Essa população mostrou maior resposta à fertilização fosfatada, o que sugeriu um possível controle genético sobre tal fator.

Sendo os taninos e flavonoides compostos do metabolismo secundário dos vegetais, estas substâncias estão sujeitas à alteração decorrente de fatores climáticos, edáficos, manejo e ação externa por herbivoria ou patógenos. Dentre os aspectos edáficos mais limitantes ao crescimento vegetal está a acidez do solo. Assim, as pastagens naturais do sul do Brasil crescem em solos com elevada concentração de Al, além de baixa fertilidade.

2.2 Acidez do solo

2.2.1 Generalidades

A acidez dos solos brasileiros é uma das principais causas da baixa produtividade encontrada no país. Os solos ácidos contêm teores tóxicos de Al, de manganês (Mn), baixos teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) além de dificultar uma adequada absorção de nutrientes (RAIJ, 2011).

O Al é um dos principais elementos minerais do solo e compreende cerca de 7% da crosta terrestre. Como consequência das precipitações pluviométricas, da drenagem da solução do solo ao longo do perfil, ocorre a lixiviação de cátions com reações básicas, como Ca, Mg e potássio (K), diminuindo o pH do solo. Em pH baixo, o H^+ atua sobre os minerais, liberando Al^{3+} que fica predominantemente retido à argila do solo. Assim, quanto mais ácido o solo, maior a quantidade de Al (BOHNEN et al., 2006). Em pH neutro ou fracamente ácido, esse cátion predomina sob a forma insolúvel de aluminossilicato ou óxido e hidróxido. Quando o solo torna-se mais ácido, com pH inferior a 5, o Al é solubilizado, atuando na solução do solo, sendo absorvido pelas raízes das plantas e causando fitotoxidez.

Os solos do Rio Grande do Sul são naturalmente pobres em P e K. Levantamento sobre os resultados de análises de solo, efetuadas em laboratórios de rotina deste estado, mostrou que 44% das amostras analisadas, tinham valores de pH em água menores que 5,5 (SANTOS et al., 2001).

2.2.2 Toxidez de alumínio às plantas

Como base para o crescimento das plantas, o solo condiciona o bom desenvolvimento vegetal às suas propriedades químicas, físicas e biológicas. A acidez, por sua vez, aumenta a atividade do Al na solução do solo, restringindo o crescimento da planta (SOUZA et al., 2007). Quando esse cátion é absorvido pelas plantas, ele inibe o alongamento da raiz severamente e em poucas horas (VARDAR & ÜNAL, 2007). A toxidez por Al em solos ácidos é o primeiro fator limitante à produção agrícola em muitas regiões do globo terrestre, principalmente, aquelas de climas tropicais e subtropicais.

O Al interfere em uma gama de processos físicos e celulares. A toxidez potencial de Al pode resultar em complexas interações com o apoplasto, membrana plasmática e alvos simplásticos. Alguns sintomas e respostas do Al-tóxico são detectáveis dentro de segundos a minutos após a exposição ao Al, outros são apenas perceptíveis após exposição em longo prazo (KOCHIAN et al., 2005).

Embora uma grande parte do Al interaja com alvos apoplásticos, uma pequena fração entra no simplasto e interage com metais. A gravidade da toxicidade do Al depende das concentrações de Ca^{2+} e de outros cátions na solução externa, da força iônica das soluções, pH, presença de quelantes, tipo de célula e genótipo da planta (VARDAR & ÜNAL, 2007). A toxidez pelo Al causa inibição do crescimento de raízes e caules, alteração do conteúdo de metabolitos e de proteínas em células radiciais, causando disfunção

metabólica no citosol, nas mitocôndrias e em outros componentes celulares (NAVASCUÉS et al., 2012).

O sintoma mais evidente e mais rápido da toxidez do Al é a inibição do crescimento e danos no sistema radicial (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001). Estas alterações na morfologia radicular resultam em curvaturas, inchaços, rachaduras, rompimentos, alterações na coloração, endurecimento. As raízes finas e os pêlos radiciais são reduzidos como decorrência da ação do Al. Ocorre o espessamento radial desigual das células, originando córtex desparelho, o que causa estresse mecânico sobre a epiderme. Todos estes danos resultam em sistemas radiciais reduzidos e danificados, com absorção limitada de água e de nutrientes.

Os danos observados em caules são considerados respostas aos danos radiciais. Nos caules os sintomas podem aparecer como modificações celulares nas folhas, abertura estomática reduzida, diminuição da atividade fotossintética, clorose e necrose foliar (VARDAR & ÜNAL, 2007). Existem trabalhos demonstrando que a presença do Al induz ao aumento de Ca^{+2} citotóxico nas pontas de raízes que, é capaz de interromper os processos metabólicos dependentes de Ca, como divisão e alongamento celular, e termina por inibir o crescimento radical (MA et al., 2002).

O acúmulo de Al na parede celular exerce um efeito prejudicial sobre o crescimento e função das raízes de três maneiras. Primeiramente ocorre uma diminuição da absorção de cátions básicos, que conjugados ao Al possuem limitada capacidade de deslocamento. O Al ligado à parede celular reduz a expansão celular, o alongamento da raiz, a absorção de nutrientes e a circulação de

água e solutos através do apoplasto (KOCHIAN et al., 2005; VARDAR & ÜNAL, 2007). Íons de Al ligados na membrana plasmática perturbam o processo de transporte através da membrana plasmática e podem diminuir a divisão celular através da sua interferência na síntese de DNA (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001; SINGH et al., 2012). Por conseguinte, a forte e rápida ligação de Al pode alterar as propriedades mecânicas e estruturais da parede celular tornando-a mais rígida, reduzindo a extensibilidade mecânica desta particularmente necessária para a expansão de células normais na zona de alongamento da raiz (KOCHIAN et al., 2005; VARDAR & ÜNAL, 2007).

A membrana plasmática também é alterada pela conjugação do Al. As interações podem modificar a estrutura da membrana plasmática, bem como o ambiente iônico próximo da superfície da célula, conduzindo a distúrbios no transporte de íons em processos que podem perturbar a homeostase celular (KOCHIAN et al., 2005).

Vários estudos têm mostrado que a rizotoxidez causada por baixo pH (<5,0) induz à acidificação citoplasmática, despolarização da membrana, distúrbios na permeabilidade e alteração no fluxo de íons e em atividades enzimáticas. Já, o estresse por Al afeta a permeabilidade, potencial e respiração das membranas de células corticais de ponta de raiz. A despolarização da membrana está estritamente relacionada à sensibilidade ao Al em cultivares de cornichão. Genótipos mais tolerantes demonstraram despolarização mais forte do que genótipos sensíveis (PAL'OVE-BALANG et al., 2012).

Raízes de cornichão expostas ao Al apresentaram alto conteúdo de ácido málico, succínico e fumárico, demonstrando que o estresse causado pelo Al está diretamente ligado a alterações na síntese de ácidos orgânicos e na regulação de enzimas chave para a desintoxicação de Al (NAVASCUÉS et al., 2012). Em estudo de Piñeros et al. (2005) foi observado que genótipos de milho (*Zea mays* L.) tolerantes ao Al exibiram forte exsudação de Al quelatizado por ácidos orgânicos, evidenciando que, embora a liberação de ácidos orgânicos pela raiz possa desempenhar um papel na resistência ao Al, não é claramente o único, ou o principal mecanismo de operação de resistência.

Os níveis de macro e micronutrientes nos tecidos das plantas também são afetados pelo Al e a magnitude deste efeito depende de genótipos e da concentração de Al (MACEDO & JAN, 2008).

2.2.3 Efeito em pastagens naturais

Pastagens naturais e cultivadas são uma base importante para alimentação em países latino-americanos. No Rio Grande do Sul as pastagens naturais cobrem uma área aproximada de 12 milhões de hectares e constituem o grande recurso forrageiro responsável pela produção animal. A utilização de campos nativos gaúchos teve início no século XVII, e hoje exige formas de utilização mais racionais de seus recursos forrageiros. O melhoramento de pastagens deve ser integrado aos diferentes sistemas de produção agropecuários com alternativas que possam gerar incrementos na sua produtividade como o uso de pastagens cultivadas, a conservação de forragem, adubação e

o próprio melhoramento de pastagem natural pela introdução de espécies (MOOJEN & MARASCHIN, 2002).

No RS a introdução de espécies forrageiras para a melhoria de campos nativos está limitada à acidez do solo. Muitas das espécies leguminosas sobressemeadas não toleram a baixa fertilidade e a acidez dos solos. Entre as leguminosas forrageiras introduzidas e adaptadas para o sul do Brasil, as espécies de *Lotus* spp. possuem bom rendimento e toleram a acidez e a baixa fertilidade dos solos. As espécies deste gênero têm as vantagens de não causarem timpanismo, adaptam-se a solos inférteis, e são moderadamente tolerante a baixos pH e salinidade do solo (MAROSO et al., 2009).

2.2.4 Medidas preventivas e corretivas

Cinquenta por cento dos solos potencialmente aráveis são ácidos e em pH baixo ($\text{pH} < 5,0$) formas tóxicas de Al são solubilizadas na solução do solo, inibindo o crescimento radicular e reduzindo o rendimento de grãos (KOCHIAN et al., 2005). Porém, se corrigidos corretamente, possuem alto potencial produtivo. Os ganhos de produtividade seriam decorrentes da neutralização da acidez, das melhorias no ambiente de crescimento radicular, tanto em relação ao uso da água, como da disponibilidade nutricional e das características químicas do solo (SOUZA et al., 2007).

A redução do teor de Al do solo pode ser obtida com a calagem, ou o seu efeito pode ser evitado com a utilização de cultivares tolerantes. Estas medidas podem atenuar ou eliminar os efeitos negativos da acidez e aumentar o fornecimento de alguns nutrientes, como Ca e Mg (SOUZA et al., 2007). Além disso, podem

diminuir os custos de implantação e de manutenção da cultura e permitir melhor desenvolvimento em situações de estresse hídrico, pois as plantas tolerantes apresentam melhor desenvolvimento do sistema radicial (JANKE et al., 2010).

Devido à importância agronômica, o melhoramento de culturas para a resistência ao Al tem sido uma área de sucesso e alvo de muitas pesquisas (KOCHIAN et al., 2005). O desenvolvimento de cultivares capazes de crescer e se estabelecer em solos ácidos é uma alternativa ambiental e economicamente sustentável, pois melhora o uso da água e auxilia na redução dos custos com calagem (JANKE et al., 2010). No entanto, os princípios moleculares, genéticos e fisiológicos ainda não são bem compreendidos. Apesar do interesse de muitos investigadores, nenhum gene de resistência ao Al foi ainda clonado (KOCHIAN et al., 2005).

Plantas que existem na presença de Al potencialmente tóxico devem ser capazes de evitar o contato direto de íons Al^{3+} às estruturas vitais e processos metabólicos. Os mecanismos fisiológicos de resistência ao Al podem ser mediados através de exclusão de Al a partir do ápice ou tolerância de Al intracelular transportado via simplasto. A precipitação extracelular ou desintoxicação de Al^{3+} são mecanismos implícitos de exclusão (KOCHIAN et al., 2005).

As plantas podem ser capazes de tolerar altos níveis de Al no simplasto ou ser capazes de desintoxicarem-se. As espécies diferem quanto ao grau de tolerância ao Al, característica essa que é geneticamente controlada, podendo ser monogênica ou poligênica dependendo da espécie. A fitotoxicidade do Al é um mecanismo de tolerância complexo e a multidisciplinariedade pode auxiliar na

elucidação dos vários aspectos envolvidos na obtenção de cultivares tolerantes (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001). No contexto do trabalho, os mecanismos das plantas que possibilitam a tolerância ao Al tem relevância, pois estão relacionados com a produção e exudação de compostos metabólicos. O subitem a seguir, enfatiza estes aspectos.

2.2.5 Mecanismos de tolerância ao alumínio

O Al tende a formar complexos fortes com doadores de oxigênio. Evidências experimentais mostraram que a complexação com exsudatos quelantes ou ligação à mucilagem podem desempenhar um papel principal na prevenção do acúmulo de Al fitotóxico no apoplasto e no simplasto (KOCHIAN et al., 2005; VARDAR & ÜNAL, 2007)

A resistência a este elemento químico pode ser ativada via mecanismos que facilitem a sua exclusão pelo ápice radicial e ou mecanismos que confirmam tolerância a sua presença (KOCHIAN et al., 2005). O primeiro mecanismo está relacionado à habilidade de excluir o Al, imobilizá-lo nas paredes celulares, à permeabilidade seletiva na membrana plasmática, à formação de uma barreira de pH induzida na rizosfera e à exclusão de ligantes quelados (KOCHIAN et al., 2005). O segundo envolve mecanismos de tolerância a altas concentrações de Al no simplasto da raiz e pode estar relacionado à quelação no citosol, seqüestro de Al nos vacúolos por carboxilatos, compartimentação, ligações Al-proteínas e evolução de enzimas tolerantes ao Al (KOCHIAN et al., 2005). Plantas como trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) conseguem acumular

Al na forma iônica em vacúolos de células da epiderme e do ápice radical, o que caracteriza tolerância ao Al (PIÑEROS et al., 2005).

As evidências deste mecanismo de resistência ao Al que envolve a desintoxicação e seqüestro interno são recentes. Porém as evidências mais convincentes concentram-se em uma resistência com base no mecanismo de quelação e de exclusão de Al extracelular via Al-ácido orgânico ativado (PIÑEROS et al., 2005; KOCHIAN et al., 2005). A exsudação de quelatos de Al reduz a atividade de íons livres de Al e, conseqüentemente, a sua ligação com a parede celular de raiz e/ou membrana plasmática. O tipo de carboxilato secretado por raízes pode variar, dependendo da espécie de planta tolerante ao Al, porém a secreção de citrato e malato são as mais comumente citadas (KOCHIAN et al., 2005; VARDAR & ÜNAL, 2007). A resistência ao Al em um grande número de magnoliófitas foi correlacionada a altos níveis de liberação de Al quelado a citrato, oxalato e malato (NAVASCUÉS et al., 2012).

Nas plantas, o Al torna-se complexo com fosfato e carboxilatos secretados do ápice radicial, mas pode também formar complexos fortes com substâncias fenólicas, pectatos, ou polissacarídeos sideróforos (KOCHIAN et al., 2005; VARDAR & ÜNAL, 2007). Grupos fenólicos são fortes elementos quelantes de Al e podem contribuir para a desintoxicação em baixas quantidades capazes de superar as barreiras operacionais em variedades tolerantes (PAL'OVE-BALANG et al., 2012).

Exsudação de compostos fenólicos tem sido descrito por muitos autores e são capazes de inverter os efeitos tóxicos do Al. No entanto, eles são menos eficientes em concentrações equimolares de

citrato. Através de uma reação de desprotonação, os fenóis em presença de grupos carboxílicos, a partir de ácidos orgânicos, podem estreitar a interação entre Al^{3+} e o ácido orgânico ligante, aumentando a estabilidade para o complexo. Também tem sido argumentado que fenóis podem favorecer a ligação Al-ácido orgânico por inibir microorganismos da rizosfera capazes de degradar os ácidos orgânicos (VARDAR & ÜNAL, 2007).

Taninos também estão envolvidos na estocagem de Al nos vacúolos. A exposição ao Al aumenta significativamente o conteúdo de taninos em raízes de cornichão. Diferenças no conteúdo de TC entre cultivares não foram verificadas, portanto a exsudação de ácidos orgânicos pode ser uma possível razão para as diferenças na tolerância ao Al entre as cultivares. Quando avaliados apenas em pH baixo, sem a presença de Al, as cultivares não apresentaram nem ácidos orgânicos, nem taninos, o que justifica o papel especializado destes metabolitos na desintoxicação de Al (PAL'OVE-BALANG et al., 2012).

Investigações recentes mostraram que houve indução pelo Al de exsudação de flavonoides do tipo quercetina e catequina em pontas de raiz de uma variedade de milho resistente ao Al. O estímulo da exsudação desses compostos fenólicos do tipo flavonoides foi de acordo com a proteção do alongamento da raiz contra o Al. As investigações sobre maior número de variedades de milho e outras espécies são necessárias, a fim de ver se esta exsudação de flavonoides é uma particularidade de certas variedades de milho resistentes ao Al ou uma propriedade comum do grupo de espécies resistentes ao Al (KIDD et al., 2001).

2.3 O gênero *Lotus* L.

2.3.1 Generalidades

O gênero *Lotus* L. compreende de cem a duzentas espécies da família Fabaceae e possui dois centros de origem principais, a região mediterrânea, que se estende aos desertos africanos e áreas temperadas da Ásia, e a região oeste da América do Norte (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997). Espécies do gênero são encontradas mundialmente, adaptadas a diversos habitats. As espécies são anuais ou perenes, encontradas preferencialmente em regiões de clima temperado úmido, com exceção de regiões frias do Ártico e áreas de várzeas tropicais da Ásia, centro e sul da América (ARAMBARRI, 1999; KIRKBRIDE, 1999). Apesar de apresentarem melhor crescimento em temperaturas relativamente altas e com susceptibilidade ao congelamento, as espécies de *Lotus* L. são consideradas plantas de estação fria, que podem desenvolver-se em climas mais quentes em condições adequadas de umidade.

A latitude é um fator limitante no crescimento de *Lotus* spp., que não se desenvolvem abaixo de 30° Norte ou Sul. Este fato é explicado por serem plantas de dia longo e exigirem 14 h/luz/dia para floração. O crescimento em altas temperaturas, encontradas próximas aos trópicos, tende a promover doenças de folha e coroa, o que restringe a produção e diminui a persistência das plantas. Outro fator limitante na utilização dessas leguminosas é o seu baixo estabelecimento devido ao pequeno vigor e tamanho de sementes. A maior fonte de recursos genéticos de *Lotus* L. está na Nova Zelândia (GREENE, 1999). É um gênero de fácil identificação entre as

leguminosas, tanto em fase reprodutiva quanto vegetativa, devido as suas características morfológicas. Devido ao alto grau de variabilidade e de polimorfismos descobriu-se que é um gênero sujeito a hibridizações intra e interespecíficas (ARAMBARRI, 1999; GRANT, 1999; KIRKBRIDE, 1999). Muitos grupos de *Lotus* spp. foram construídos com base na morfologia vegetativa da planta, incluindo seus polimorfismos sazonais (ARAMBARRI, 1999). As características morfológicas, que são distintas entre as espécies, são responsáveis pelas diferenças na adaptação ao ambiente (BLUMENTHAL & MCGRAW, 1999).

Muitas espécies são endêmicas em determinadas regiões do mundo, capazes de se adaptar a solos alcalinos como *L. glaber* Mill. (sin.: *L. tenuis*), ou a regiões úmidas como o cornichão-dos-banhados (*L. uliginosus* Schkuhr; sin.: *L. pedunculatus*), ou ainda se naturalizar em diversas áreas como o cornichão (ARAMBARRI, 1999; KIRKBRIDE, 1999).

As espécies mais importantes do gênero *Lotus* L. são o cornichão, o cornichão-dos-banhados e o cornichão-anual (*L. subbiflorus* Lag), pelos elevados teores de proteína bruta (MONTEIRO & PAIM, 1982; SCHEFFER-BASSO et al., 2001), tolerância a solos ácidos (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1998) e por não causarem timpanismo.

As espécies desse gênero são usadas principalmente para pastejo direto ou para produção de feno, controle da erosão do solo e, ocasionalmente, como plantas ornamentais. Apesar das espécies anuais apresentarem um enorme potencial em relação à tolerância ao Al, Mn e NaCl, a única espécie anual utilizada mundialmente é o

cornichão-anual, representado pela cv. El Rincón (BLUMENTHAL & McGRAW, 1999).

Um dos motivos da popularidade de *Lotus* spp. como pastagens, além da produtividade e adaptabilidade, é que não ocasionam o timpanismo, ao contrário do que ocorre em pastagens de trevo-branco nas quais o timpanismo pode promover a mortalidade de ruminantes. Em *Lotus* spp. a presença de TC é o fator que evita este desajuste.

2.3.2 Taninos condensados em *Lotus* L.

O cultivo de *Lotus* spp. ocorre em situações onde existam as mais adversas condições edáficas e nutricionais. Estas condições bióticas e abióticas extremas influenciam o nível de TC, afetando o metabolismo de nutrientes e a aceitabilidade da forragem (KELMAN & TANNER, 1990).

O gênero *Lotus* L. possui variabilidade significativa no conteúdo de TC inter e intrapopulacional em folhas, caules e raízes (ESCARAY et al., 2007). As divergências na literatura a respeito das concentrações de taninos em *Lotus* spp. indicam a existência da interação genótipo x ambiente, bem como da diferença de concentração nos distintos órgãos das plantas (CARTER et al., 1999), o que poderia ser um fator para explicar tais variações.

A variação dessas substâncias em função do ambiente foi relatada por Barry & Forss (1983). Gebrehiwot et al. (2002) apontaram diferenças marcantes quanto aos teores de TC em cornichão, cornichão-dos-banhados e *L. glaber*, mas verificaram que os teores não variaram entre plantas cultivadas no campo e em

ambiente protegido. Isso sinalizaria para a validade de realizar a seleção de genótipos quanto a esse atributo em casa-de-vegetação.

Haring et al. (2007) verificaram que em cornichão a concentração de TC em folhas (43 g/kg) foi o dobro em relação à raiz (26 g/kg), enquanto em caules foi de apenas 12 g/kg. Segundo os autores, para que haja melhor previsão das variações estacionais desses compostos, a alocação da matéria seca (MS) nas plantas é uma importante informação a ser obtida. Assim, para haver maior precisão na determinação dessas substâncias na forragem disponível aos animais, deveria ser considerada a concentração de TC nas distintas partes da planta.

Anuraga et al. (1993) não observaram efeito da temperatura atmosférica e umidade do solo na concentração de TC em cornichão e cornichão-dos-banhados, sendo constatado que o potencial para elevação desses compostos foi implementado quando houve restrição ao crescimento das plantas pelo estresse hídrico e térmico. Por esse motivo, os autores recomendaram uma cuidadosa triagem nas concentrações de TC no desenvolvimento de novas cultivares. Sivakumaran et al. (2006), pesquisando sobre a variação de TC em 15 espécies de *Lotus* L. encontraram valores estimados entre 2 a 74 g de TC/kg de MS no inverno e 7 a 109g de TC /kg de MS na primavera, sendo que cornichão apresentou concentrações de 22 g de TC/kg de MS no inverno e 55 g de TC/kg de MS na primavera. Os autores consideram que plantas que contenham alta concentração de taninos podem ser encontradas em ambientes com baixa disponibilidade de recursos. A acidez e solos inférteis em

baixas e altas altitudes podem favorecer o acúmulo de taninos nos tecidos vegetais.

2.3.3 *Lotus corniculatus* L.

O cornichão é a espécie de maior amplitude ecogeográfica dentre as encontradas no gênero *Lotus* L. É adaptada a diversas condições edáficas, como solos secos, mal drenados, ácidos, salinos e inférteis, onde normalmente outras leguminosas não se estabelecem ou tem pouca persistência (GREENE, 1999). É uma leguminosa forrageira de grande importância em diversos países, especialmente o Uruguai, onde é utilizada no melhoramento de extensas áreas de pastagens naturais. O cornichão é usado para estabilização de solos, revegetação e pastagens (BLUMENTHAL & MCGRAW, 1999).

É uma espécie perene, que pode persistir na pastagem por meio da sobrevivência da planta-mãe e por ressemeadura natural (MAROSO & SCHEFFER-BASSO, 2007). Apesar da tolerância a solos pobres e ácidos, responde bem à calagem e, para produções adequadas, a fertilidade deve ser melhorada, principalmente com aplicações de P e K (HUGHES, 1981). O cornichão também pode ser utilizado para redução de níveis excessivos de selênio e boro em ambientes irrigados (GREENE, 1999).

A vasta adaptação ambiental dessa leguminosa originou-se da contínua hibridização intraespecífica. A espécie apresenta polimorfismo para muitos caracteres como hábito de crescimento, grau de pubescência, cor de folha, número de flores por umbela, compatibilidade reprodutiva, morfologia de raiz, cariótipo,

características de qualidade de forragem, resistência a insetos e constituição molecular e bioquímica (STEINER, 1999).

A única cultivar desenvolvida no Brasil é a cv. São Gabriel, resultante de trabalhos realizados na Estação Experimental de São Gabriel, Rio Grande do Sul, entre 1955 e 1965, quando seu cultivo se expandiu para outros países da América do Sul (PAIM, 1988). Essa cultivar apresenta melhor desenvolvimento com pH do solo entre 6,0 e 7,0 (PRESTES & JACQUES, 2002). Apresenta versatilidade quanto ao manejo e alterações na distribuição da produção anual, com maior concentração no verão quando o primeiro corte ocorre no florescimento (SCHEFFER-BASSO et al., 2005).

Sua baixa utilização no sul do Brasil pode estar ligada ao hábito não propício ao pastoreio (MAROSO & SCHEFFER-BASSO, 2007), que facilita a remoção das gemas responsáveis pelo rebrote das plantas. Outro fato importante é que quando em consorciações com espécies mais agressivas, o cornichão perde espaço por apresentar menor taxa de crescimento. A baixa taxa de crescimento das plântulas de cornichão está relacionada com a sua alta relação raiz: parte aérea, fator este que o torna competitivo em solos de baixa fertilidade onde um sistema subterrâneo mais desenvolvido confere maior habilidade de absorção de nutrientes (ELIAS & CHADWICK, 1979).

Existem publicações na literatura sobre produção de metabólitos secundários nessa espécie, porém há poucas informações sobre a cv. São Gabriel. Nesse sentido, destaca-se o estudo de Moro et al. (2010), que determinaram teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN),

fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e TC. Os autores obtiveram de 1,99 g de TC/kg de MS e flavonoides do tipo rutina e vitexina na cv. São Gabriel. Em recente trabalho de Koelzer et al. (2009) foram evidenciados os compostos canferitrina, ácido oleanólico e β -sitosterol na mesma cultivar, em que ficou comprovada a sua atividade anti-inflamatória e antibacteriana. Hedqvist et al. (2000) encontraram baixos níveis nessa espécie entre 2 e 17 g de TC/kg de MS. Ramirez-Restrepo et al. (2004, 2006) verificaram teores de 8,3 a 28,7 g de TC/kg de MS e Acuña et al. (2008) obtiveram valores entre 47 e 87 g de TC/kg de MS para o mesmo atributo.

Ehlke & Le Gare (1993) constataram que elevadas temperaturas reduziram os teores de TC na maioria dos acessos de cornichão, demonstrando que a produção desses metabólitos não é previsível para plantas testadas em somente um ambiente, principalmente no caso de programas de melhoramento genético. Foo et al. (1996), estudando as proantocianidinas em cornichão, encontraram que os TC desta espécie são formados principalmente por epicatequina (67%) e epigalocatequina (30%), com menores quantidades de catequina. Essas substâncias são monômeros de TC cuja proporção pode variar entre espécies.

Para Reynaud & Lussignol (2005), há indícios de que o cornichão possui riqueza e diversidade de flavonoides e que o estudo de tais substâncias pode ser utilizado em investigações sobre a especiação do complexo *L. corniculatus* (cornichão) ou da variação de flavonoides em função da altitude. Os autores verificaram que as plantas tetraplóides mostraram maior diversificação quanto ao conteúdo de polifenóis. Além disso, em maiores altitudes, com

condições climáticas normalmente mais instáveis, foram encontraram dois tipos diplóides da espécie, com perfil homogêneo e pouca quantidade de polifenóis.

2.3.4 *Lotus uliginosus*

O cornichão-dos-banhados tem distribuição mais restrita, condições edáficas e climáticas mais específicas em relação ao cornichão. No entanto, tem elevada adaptação a solos ácidos, de baixa fertilidade e com altas concentrações de Al (BLUMENTHAL & McGRAW, 1999).

É uma espécie perene rizomatosa e estolonífera, promissora quando sobressemeada em locais úmidos, e facilmente superada por trevo-branco quando semeada em terras de montanha, devido a sua menor tolerância ao congelamento. Adapta-se melhor a altas temperaturas do que o cornichão, sendo que a taxa de crescimento aumenta quando cultivado em temperaturas de 22 a 26°C. Relatos antigos afirmam que o cornichão-dos-banhados possui extenso sistema subterrâneo, formado por coroa e raiz pivotante central que dão origem a uma rede de rizomas, estolões e raízes fibrosas capazes de colonizar o solo com sucesso e formar um tapete natural (CARÁMBULA et al., 1994a). No entanto, Maroso et al. (2009) apontaram que os caules subterrâneos, até hoje citados como rizomas, na maioria dos trabalhos, não são, de fato, rizomas. Os autores, mediante estudos ontogenéticos e anatômicos, constataram que são caules sobolíferos, cuja origem não é na plúmula do embrião, e sim, adventícia.

É uma espécie muito apreciada pelos produtores rurais na Nova Zelândia e nos Estados Unidos para ser cultivada para feno e produção de silagem (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997). Na Austrália, seu cultivo tornou-se interessante após o reconhecimento de suas potencialidades: não provocar timpanismo, aumentar a absorção de aminoácidos no rúmen, resistir a insetos, superar as produções de trevo-branco quando em solos com pH abaixo de 5,2, tolerar solos alagados e ser eficiente na absorção de P (HARRIS et al., 1983). Mostrou-se mais adequada em áreas ensolaradas de altas altitudes e, quando em áreas de pastagens melhoradas, nas quais a capacidade competitiva não foi favorecida pelas condições edáficas, a espécie obteve fracasso. No entanto, é considerada uma espécie de baixo desempenho produtivo, estabelecimento lento e baixa habilidade competitiva quando acompanhada por outras espécies (BLUMENTHAL & MCGRAW, 1999).

A cultivar mais amplamente cultivada é a cv. Maku, selecionada a partir de ecótipos neozelandeses, com introduções de Portugal, que após a seleção sofreu duplicação cromossômica (CARÁMBULA et al., 1994a). Após longo período de seleção, a cv. Maku apresentou uma melhora na capacidade produtiva, tamanho de semente, vigor de plântulas, tamanho de folhas e espessura de caules (ARMSTRONG, 1974; HERNANDEZ et al., 2005).

De genoma tetraplóide, o cornichão-dos-banhados possui ótimo crescimento hibernal, persistência e alta produção de forragem, características estas direcionadas a melhora de campo nativo com pecuária extensiva (CARÁMBULA et al., 1994a). Os tipos de solo

possuem um grande efeito no estabelecimento desta espécie, que prefere solos úmidos (HERNANDEZ et al., 2005).

Trazido para o Brasil, a cv. Maku apresentou elevada capacidade de estabelecimento em solos mal drenados, mas escasso florescimento. A seleção genética com linhas de policruzamento pela Epagri, em Santa Catarina, deu origem à cv. Serrano, com algumas características peculiares, como folíolos com pouca pilosidade, tolerância ao sombreamento, bom estabelecimento e produção de sementes viáveis (SCHEFFER-BASSO et al., 2002; EPAGRI, 2012). A cv. Maku possui maior conteúdo de proteínas e de polímeros flavônicos quando comparado ao cornichão (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997).

Em estudo de Kelmar & Tanner (1990), o cornichão-dos-banhados se destacou por ser a espécie com a maior concentração de TC, com média de 59,9 g/kg sendo que vários acessos de outras espécies de *Lotus* spp. caracterizaram-se por apresentar níveis de taninos inaceitáveis (> 60g/kg MS). Os níveis de TC observados por Gebrehiwot et al. (2002) foram maiores na primavera do que no verão, o que foi atribuído ao estresse térmico prolongado, que induziu a quebra de TC anteriormente formados. Kelman (2006) agrupou 38 acessos dessa espécie a partir da região de origem e demonstrou que a espécie superou em 2% a concentração de TC encontrada em cornichão. Os acessos originários de Portugal obtiveram os mais altos valores, com 57 g de TC /kg de MS de folhas e 80 g de TC/kg de MS de folhas e caules. O autor concluiu que os TC estão negativamente correlacionados à digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS) e ao teor de nitrogênio (N) na planta. De acordo com Foo et al. (1996),

há diferenças no tamanho e na composição de polímeros de cornichão e cornichão-dos-banhados, ao avaliarem os TC. Tanner et al. (1994), igualmente, mostraram que no cornichão esses compostos foram mais inibitórios na degradação da proteína em relação aos encontrados no cornichão-dos-banhados. Acuña et al. (2008) concluíram que a variabilidade genética encontrada nessa espécie fez com que os níveis de TC diferissem entre locais de cultivo, o que permitiu a identificação de genótipos úteis ao melhoramento genético.

2.3.5 *Lotus subbiflorus*

O cornichão-anual, como seu próprio nome comum refere, possui duração anual. Tem hábito prostrado, boa adaptação a distintas condições ecológicas e de manejo. É uma espécie europeia que se distribui por todo o Mediterrâneo, norte da África e Turquia, chegando à Inglaterra e Irlanda (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997). Possui raiz principal delgada, sem rizomas, é pouco pilosa e com poucos caules. Foi acidentalmente introduzida no Uruguai e atualmente é utilizada para a melhoria de pastagens e produção de feno (KIRKBRIDE, 1999).

A cv. El Rincón foi liberada em 1987 e tem como característica a boa adaptação às condições adversas de solo, produzindo forragem de boa qualidade, alto rendimento, excelente persistência e sobressemeadura natural (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997; GREENE, 1999). Possui capacidade de colonização bem definida, adaptada a diferentes tipos de semeadura em pastagens naturais, sem dificuldade de se integrar à vegetação existente, baixos custos de instalação e manutenção, produtividade e rusticidade sem

requerimentos especiais de manejo, bem adaptada em áreas de pecuária extensiva (BARRIOS et al., 2010).

Essa cultivar possui prolongado processo de germinação, suas plântulas tem baixo crescimento inicial e estabelecimento muito lento (AYALA & BERMUDEZ, 2001). Necessita de condições de umidade e temperaturas ótimas para que alcance populações adequadas, que conduzam à boa disponibilidade de forragem (CARÁMBULA et al. 1994b).

A espécie é responsiva à adubação fosfatada e seu pico de produção é a partir do final do período hibernar (DAVYT & IZAGUIRRE, 1997). Quanto mais definida e seca tenha sido a temporada estival, maior será o êxito na produção de sementes assim como a ressemeadura natural (CARÁMBULA et al., 1994b). Atualmente, o cornichão-anual tem aparecido espontaneamente em pastagens naturais do Rio Grande do Sul, provavelmente como impureza em lotes de sementes de outras espécies importadas do Uruguai (SCHEFFER-BASSO et al., 2002).

São poucos os trabalhos que relatam a composição química desta espécie. Kelman & Tanner (1990) observaram que a espécie não apresentou variação no nível de TC entre solos de distinto pH, com média de 31,6 g de TC/kg de MS. Krolow et al. (2004), avaliando os efeitos de P e K na composição bromatológica de leguminosas, verificaram que a cv. El Rincón apresentou maiores teores de PB, P e K na matéria seca em relação ao trevo-persa (*Trifolium resupinatum* L. cv. Kyambro) e ao trevo-subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L. cv. Woogenellup).

3 Material e métodos

O trabalho constou de dois ensaios, para a obtenção de extratos vegetais de *Lotus* spp. e validação de métodos de CLAE, para determinação de taninos (catequina, epicatequina e ácido gálico) e flavonoides (rutina, quercetina e canferol).

Os ensaios foram conduzidos na Universidade de Passo Fundo, na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul, com coordenadas de 28° 15' S, 52° 24' W e a 687 m de altitude, entre junho de 2011 e novembro de 2012. O clima é fundamental úmido (Cfa) e variedade subtropical (Cfa), com temperatura média anual de 22 °C (KUINCHTNER & BURIAL, 2001). As temperaturas médias normais e ocorridas durante o período experimental constam na Figura 1.

3.1 Material vegetal

Para obtenção do material vegetal foram desenvolvidos os seguintes ensaios:

3.1.1 Ensaio I – Taninos e flavonoides em *Lotus* spp. sob distintos níveis de acidez do solo

3.1.1.1 Tratamentos e delineamento experimental

Neste ensaio, foram avaliadas as concentrações de taninos e flavonoides de duas cultivares (cv. São Gabriel e cv. Ganador) e da população UFRGS de cornichão, de uma cultivar de cornichão-dos-banhados (cv. Serrano) e uma cultivar de cornichão anual (cv. El Rincón). O material cultivado foi submetido a duas condições de

acidez do solo, em fatorial 5 x 2. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, totalizando quarenta unidades experimentais.

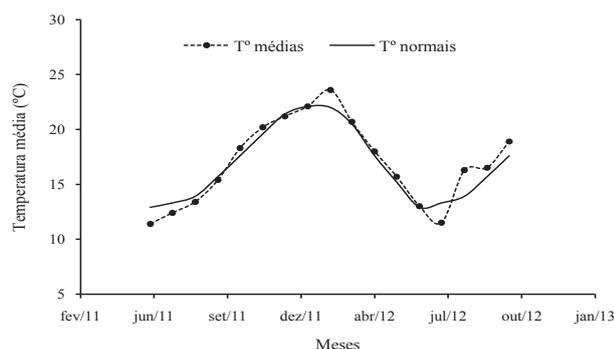


Figura 1. Temperaturas médias ocorridas no período experimental e normais regionais. Fonte: Embrapa Trigo. <http://www.cnpt.embrapa.br>.

3.1.1.2 Condução do ensaio

O cultivo das plantas ocorreu em condições de ambiente semi-protegido, composto por cobertura impermeável transparente e paredes de tela metálica transparente (Figura 2). As unidades experimentais foram vasos com capacidade para 7 kg de substrato seco. O substrato foi preparado com Latossolo Vermelho escuro distrófico da Unidade de Mapeamento Passo Fundo. Para isso, foi realizada uma coleta de solo, na camada de 0 a 20 cm. Após a coleta, o solo foi seco ao ar e, posteriormente, peneirado com malha de 1 cm para a retirada de torrões.



Figura 2. Vista geral do local do ensaio. Passo Fundo, RS. 2012.

Antes do experimento, o solo foi analisado conforme Tedesco et al. (1995) e os resultados da análise indicaram: pH em H₂O: 5,1; índice SMP: 5,0; P: 3,3 mg/dm³; K: 36 mg/dm³; Al: 2,9 cmol_c/dm³; Ca: 3,41 cmol_c/dm³; H+Al: 13,7 cmol_c/dm³; CTC: 22 cmol_c/dm³; saturação por bases: 37 %; saturação por Al: 20%; saturação por potássio: 0,4%. Os resultados para argila (61,7%), matéria orgânica (2,2%) e magnésio (3,0 cmol_c/dm³) mostraram-se discrepantes, acreditando-se possuir erros de quantificação. A partir da avaliação dos atributos físico-químicos, foram determinadas as quantidades de calcário necessárias para a obtenção de dois níveis de acidez, utilizando o método do índice SMP (CQFS-RS/SC, 2004).

A metade da quantidade total de solo foi corrigida com a dose recomendada de calcário para atingir o valor de pH em água= 6,0, recomendado para leguminosas temperadas, (CQFS-RS/SC, 2004), enquanto que a outra metade não recebeu calcário. Na fração

corrigida, foi adicionado o equivalente a 9,9 t/ha de calcário do tipo *filler*, 100 kg/ha de P_2O_5 , na forma de KH_2PO_4 , e 80 kg/ha de K_2O , na forma KH_2PO_4 . Para não limitar o crescimento das plantas no tratamento sem calagem, o solo recebeu o equivalente a 25 kg/ha de P_2O_5 e 20 kg/ha de K_2O . Após a adição de água na quantidade equivalente à capacidade de vaso, o calcário e os fertilizantes foram incorporados ao solo, manualmente, e o substrato foi transferido para os vasos, a fim de iniciar o período de incubação. Após três meses de incubação, mantendo-se o teor de umidade do solo, foi feita uma análise básica da composição química do solo, conforme Tedesco et al. (1995) (Tabela 1).

A semeadura foi realizada em 21 de novembro de 2011, colocando-se dez sementes por vaso. A inoculação ocorreu aos 15 dias de semeadura, mediante rega com 250 mL/vaso de uma solução de *Mesorhizobium loti* a 250 g/L. Durante o período experimental, as plantas foram mantidas sem restrição hídrica, mediante rega manual, e com a mesma quantidade de água em todos os vasos. Foi feito o controle de tripes (*Thrips* sp.), com a aplicação de thiamethoxam a 0,5 g/L, em duas ocasiões. Para o controle de oídio (*Blumeria graminis* (DC) E. O. Speer f. sp. *tritici*), foi aplicado leite de vaca (ZATARIM et al., 2005), a 10%, durante quatro dias e, após a reincidência do fungo, foi aplicado fungicida composto por azoxistrobina 20% e ciproconazol 8% (2 mL/L de água).

Tabela 1. Atributos físico-químicos de um Latossolo Vermelho escuro distrófico tratado com calcário e fertilizantes contendo fósforo e potássio após três meses de incubação

Atributo	Solo	
	Com calagem	Sem calagem
Argila (%)	32,4	37,1
pH em água	6,2	4,9
Índice SMP	6,4	5,0
P (mg/dm ³)	4,3	5,1
K (mg/dm ³)	69,0	44,0
Matéria orgânica (%)	2,5	3,3
Al (cmol _c /dm ³)	0,0	2,5
Ca (cmol _c /dm ³)	6,8	3,4
Mg (cmol _c /dm ³)	3,9	1,3
H+Al (cmol _c /dm ³)	2,8	13,7
CTC (cmol _c /dm ³)	13,7	20,3
Saturação por bases (%)	80,0	32,0
Saturação por alumínio (%)	0,0	20
Saturação por potássio (%)	1,1	0,6

No decorrer do período experimental, as plantas foram submetidas a quatro cortes, a partir do 157º dia da semeadura, a fim de obter-se material vegetal para o preparo dos extratos e evitar a senescência, que decorre da manutenção das plantas em crescimento livre. Os cortes foram feitos com tesoura, a 5 cm da base das plantas, em: 25/04, 17/07, 02/09 e 24/10/2012. O material vegetal foi pesado e levado à estufa de aeração forçada, a 30 °C, por 72 horas. Após este período, as amostras foram pesadas para determinação do teor de matéria seca e trituradas em moinho tipo Willie. O material triturado foi armazenado em ambiente sem umidade e sem incidência de luz, para minimizar a degradação química.

Ao final do experimento, as plantas foram removidas dos vasos, a fim de avaliar a nodulação e para serem feitas análises químicas do solo (Tabela 2). Para a análise do solo foi feita uma amostra múltipla para cada combinação de fator (genótipo-solo),

reunindo-se o solo das quatro repetições. Dessa forma, foram geradas dez amostras (cinco genótipos x dois tipos de solo). De posse das análises foi feita a média dos atributos químicos dos solos com e sem calagem.

3.1.2 Ensaio II – Taninos e flavonoides de *L. corniculatus* cv. São Gabriel presente em área ruderal

Para este ensaio, foram coletadas plantas de cornichão cv. São Gabriel presentes há mais de dez anos, em área ruderal, no campus da Universidade de Passo Fundo (Figuras 3 e 4). Essa população de plantas encontra-se em local antigamente utilizado para avaliação de plantas forrageiras. A coleta de solo foi feita na camada de 0 a 20 cm e a análise do solo desse local conforme Tedesco et al. (1995), indicou os seguintes resultados: argila: 50,2%; pH em H₂O: 5,1; Índice SMP: 5,7; P: 5,4 mg/dm³; K: 94 mg/dm³; matéria orgânica: 2,1%; Al: 1,4 cmol_c/dm³; Ca: 3,4 cmol_c/dm³; Mg: 1,5 cmol_c/dm³; H+Al: 6,3 cmol_c/dm³; CTC: 11,45 cmol_c/dm³; saturação por bases: 44,5%; saturação por Al: 23,5%; saturação por potássio: 2,05%.

A parte aérea das plantas foi colhida, com tesoura, a cinco cm de altura da base. A primeira coleta ocorreu quando as plantas estavam em florescimento pleno, em 29/11/2011 (Figura 5). O segundo corte ocorreu no ano seguinte, quando as plantas estavam em estágio vegetativo, em 12/09/2012.

Tabela 2. Atributos físico-químicos de um Latossolo Vermelho escuro distrófico tratado com calcário e fertilizantes contendo fósforo e potássio ao final do experimento

Atributo	Solo	
	Com calagem	Sem calagem
Argila (%)	27,3	31,7
pH em água	6,4	4,7
Índice SMP	6,6	4,7
P (mg/dm ³)	3,8	2,7
K (mg/dm ³)	49,6	35,2
Matéria orgânica (%)	2,5	2,4
Al (cmol _c /dm ³)	0,0	4,5
Ca (cmol _c /dm ³)	4,4	1,2
Mg (cmol _c /dm ³)	2,6	0,6
H+Al (cmol _c /dm ³)	2,1	18,6
CTC _{pH 7,0} (cmol _c /dm ³)	9,2	20,4
Saturação de cátions de reação básica (%)	76,8	9,2
Saturação por alumínio (%)	0,0	71,0
Saturação por potássio (%)	1,3	0,4



Figura 3. Área de coleta de plantas de *L. corniculatus* cv. São Gabriel em estágio vegetativo no campus I da Universidade de Passo Fundo.

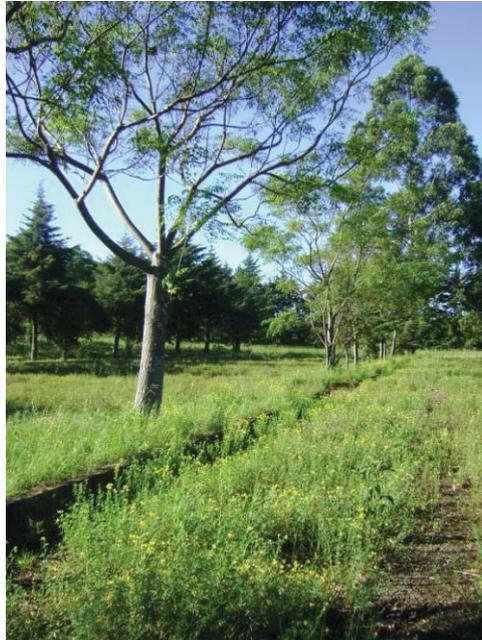


Figura 4. Área de coleta de plantas de *L. corniculatus* cv. São Gabriel em estágio reprodutivo no campus I da Universidade de Passo Fundo.

Logo após a coleta, os componentes da planta foram separados em folha+caule e flores+legumes e secos em estufa de aeração forçada, a 30 °C, por 72 horas (Figuras 6 e 7). Após este período, estas partes foram trituradas em moinho tipo Willie. O material triturado foi armazenado em ambiente sem umidade e sem incidência de luz, para minimizar a degradação química.



Figura 5. Material vegetal de *L. corniculatus* cv. São Gabriel, coletado em florescimento pleno (29/11/2011).



Figura 6. Separação dos componentes das plantas de *L. corniculatus* cv. São Gabriel, coletadas no campus I da Universidade de Passo Fundo.



Figura 7. Estruturas vegetativas e reprodutivas de plantas de *L. corniculatus* cv. São Gabriel.

3.2 Análises farmacognósticas

3.2.1 Preparo dos extratos

Para o Ensaio I, o material colhido em cada corte e repetição foi reunido em uma amostra múltipla, devido à quantidade de matéria seca (MS) não ter sido suficiente, para possibilitar que as repetições de cada tratamento fossem analisadas em separado (Tabela 3 e 4). Esse procedimento é comum em estudos farmacognósticos, sendo utilizadas replicatas em análise química de extratos obtidos de plantas (KELMAN & TANNER, 1990; ACUÑA et al., 2008).

Tabela 3. Produção de matéria seca da parte aérea de genótipos de *Lotus* spp. cultivados em solo com calcário, obtida em quatro cortes

Bloco	Genótipos				
	Serrano	UFRGS	São Gabriel	Ganador	El Rincón
----- g MS/vaso -----					
Bloco 1	15,0	28,5	27,1	28,5	17,0
Bloco 2	21,5	20,4	28,8	17,3	20,6
Bloco 3	18,5	34,4	32,6	25,9	20,6
Bloco 4	25,4	26,0	23,1	25,9	19,7
Média	20,1	27,4	27,9	24,4	19,5

Tabela 4. Produção de matéria seca da parte aérea de genótipos de *Lotus* spp. cultivados em solo sem calcário, obtida em quatro cortes

Bloco	Genótipos				
	Serrano	UFRGS	São Gabriel	Ganador	El Rincón
----- g MS/vaso -----					
Bloco 1	13,9	23,0	16,0	20,2	12,1
Bloco 2	26,7	16,5	17,2	19,0	24,2
Bloco 3	24,2	24,0	21,6	25,4	19,9
Bloco 4	21,0	21,0	18,4	23,2	25,1
Média	21,4	21,1	18,3	21,9	20,3

Para ambos os ensaios, a preparação dos extratos seguiu a seguinte rotina:

O material vegetal foi submetido à extração com metanol 50% na proporção 1:10 (planta:solvente), em temperatura ambiente (± 20 °C) por sete dias. Após o período de maceração os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 60 °C até a obtenção de extratos moles. Os extratos concentrados foram então pesados para o cálculo de rendimento de extrato seco por matéria seca de planta. Foi feita a perda por dessecação em balança de infravermelho para a retirada de substâncias voláteis e água residual. A partir dos valores obtidos na perda por dessecação, calculou-se o percentual de extrato seco (QUEIROZ et al., 2002). A partir deste valor, foi calculada a concentração de extrato mole necessária para o preparo de uma solução de 10 mg/mL de extrato seco ressuscitado em metanol. Após ressuspensão os extratos foram filtrados em membrana de nylon com diâmetro de poros de 0,45 μm .

3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Com o objetivo de identificar e quantificar prováveis metabólitos secundários das classes dos taninos e flavonoides nos extratos obtidos foi desenvolvido um método de separação e quantificação por CLAE, utilizando substâncias químicas de referência (SQR). Este método caracteriza-se por ser mais sensível e rápido, quando comparado a outros métodos colorimétricos (MAKKAR, 1989). A utilização de um método espectrofotométrico típico dá uma estimativa sobre o teor total de compostos de determinada classe, enquanto que a CLAE quantifica individualmente cada composto de interesse. No entanto, o desafio na quantificação por CLAE é o número limitado de padrões disponíveis comercialmente (ADAMSON et al., 1999). As SQR utilizadas foram adquiridas prontas, sendo informadas abaixo.

Para a análise dos extratos, primeiramente foi necessário o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação das SQR rutina, quercetina, catequina, epicatequina, ácido gálico e canferol por CLAE, conforme a resolução 889 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Os métodos foram criados e validados separadamente para cada SQR.

Foram utilizadas as SQR de rutina (Sigma Aldrich lote BCBD8327V), quercetina (Sigma Aldrich LOTE 060M1196V), catequina (Sigma Aldrich LOTE BCBC2740), epicatequina (Sigma Aldrich BCBC8078V), ácido gálico (Sigma Aldrich LOTE 54705138) e canferol (Sigma Aldrich BCBD1168). Uma solução estoque (1000 µg/mL) foi preparada para cada SQR dissolvendo-se 0,1 g de cada

substância em balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com metanol.

Primeiramente, foram realizadas varreduras das SQR (200-400 nm) em espectrofotômetro Lambda 20 (Perkin Elmer) buscando o estabelecimento dos comprimentos de onda onde ocorreram os máximos de absorção e as concentrações a serem utilizadas para cada SQR no CLAE. Após o estabelecimento dos comprimentos de onda e concentrações ideais, iniciaram-se as tentativas no CLAE, buscando a composição e concentração de fase móvel adequada para a análise das SQRs.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Flexar LC Perkin Elmer (Burnsville, MN, USA), equipado com bomba binária Flexar LC, detector Flexar PDA, auto-amostrador, onde os dados das áreas dos picos foram integrados em Software Chromera Workstation. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Brownlee (250 mm x 4,6 mm, 5 µm).

A melhor eluição dos picos, para todas as substâncias, foi alcançada com uma fase móvel constituída por água acidificada com ácido fosfórico a pH 3 e acetonitrila em diferentes proporções com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Nas condições otimizadas, o tempo de retenção de cada composto foram os seguintes: rutina: cerca de 8,1 min; catequina: 4 min; epicatequina: 5,1 min (acetonitrila:água acidificada 18:82); quercetina: 3,85 min (acetonitrila: água acidificada 45:55); ácido gálico: 3,7 min (acetonitrila:água acidificada 10:90); canferol 3,15min (acetonitrila: solução A, 30:70, v/v), sendo a composição da solução A: metanol: acetonitrila: água: ácido acético (40:15:45:2 v/v/v/v).

3.2.2.1 Validação do método

O processo de validação de metodologia para quantificação de taninos e flavonoides foi determinado mediante os seguintes parâmetros, de acordo com ICH (2005) e Brasil (2003): linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção, especificidade e robustez.

3.2.2.1.1 Linearidade, limites de detecção e de quantificação

A linearidade do método foi determinada mediante a construção de três curvas de calibração por SQR. Cada curva de calibração foi preparada com cinco pontos referentes às concentrações 20,0 40,0; 60,0 80,0 e 100,00 120,0 $\mu\text{g/mL}$ para o canferol; para as demais SQR foram utilizadas concentrações de 40,0; 80,0; 120,0; 160,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$, plotadas *versus* as áreas de pico dos cromatogramas. As concentrações das soluções-padrão foram submetidas à análise de regressão, pelo método dos mínimos quadrados, para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação. Os dados das três curvas foram analisados por ANOVA ($p < 0,05$), para verificar as seguintes fontes de variação: regressão linear, variação entre concentrações e desvio de linearidade.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005) (equações 1 e 2, respectivamente), em que: DPa é o desvio padrão do intercepto de, no mínimo, 3 curvas de calibração contendo concentrações da SQR; e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = DP_a \times 3 / IC \quad (1)$$

$$LQ = DP_a \times 10 / IC \quad (2)$$

3.2.2.1.2. Exatidão

A exatidão (E) do método foi avaliada por meio do preparo de nove determinações das SQRs, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações: baixa (100,0 µg/mL), média (140,0 µg/mL) e alta (180,0 µg/mL), com três réplicas cada. A exatidão foi calculada como percentual de recuperação e, foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme equação 3.

$$E = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100 \quad (3)$$

3.2.2.1.3 Precisão

A precisão (P) foi determinada por meio da repetibilidade (intradia), na qual foram preparadas seis amostras contendo 200 µg/mL de cada SQR, no mesmo dia. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e a precisão foi expressa em porcentagem do desvio padrão relativo (DPR). De maneira geral, para métodos analíticos um DPR menor que 5% é considerado satisfatório (BRASIL, 2003).

3.2.2.1.4 Especificidade

A especificidade do método para cada SQR foi avaliada a partir da pureza do pico através do detector de arranjo de diodos (PDA).

3.2.2.1.5 Robustez

A robustez do método foi determinada através da análise de uma mesma amostra (200 µg/mL) modificando parâmetros do método, como: fluxo, coluna e composição da fase móvel e pH. Para avaliar a estabilidade das soluções das SQR no diluente (metanol), soluções foram preparadas, mantidas em temperatura ambiente e analisadas após 48 h.

3.2.2.2 Quantificação de taninos e flavonoides em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para quantificação dos taninos e flavonoides em CLAE, os extratos hidrometanólicos foram ressuspensos na concentração de 10 mg/mL de extrato seco e filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm (Figuras 8 e 9).



Figura 8. Preparação dos extratos de genótipos de *Lotus* spp. em balões volumétricos.

Uma alíquota de 20 μL foi injetada com as condições cromatográficas condizentes aos métodos desenvolvidos para cada SQR. A área de pico de cada SQR foi determinada e utilizada para a quantificação de cada padrão presentes no extrato. Os TC foram calculados como equivalentes de catequina mais epicatequina e os flavonóides como equivalentes de rutina mais quercetina.



Figura 9. Extratos obtidos de genótipos *Lotus* spp.

O procedimento utilizado para quantificar a concentração de taninos e de flavonoides em genótipos de *Lotus* spp. está ilustrada, resumidamente, no fluxograma da Figura 10.

3.3 Análise estatística

Para análise estatística do Ensaio I, os dados obtidos no CLAE, transformados em percentual de MS (MAKKAR, 2003b), foram submetidos à Anova e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Os dados do Ensaio II, por não se dispor de graus de liberdade suficientes para geração da Anova, foram analisados por análise descritiva (média, amplitude e desvio padrão).

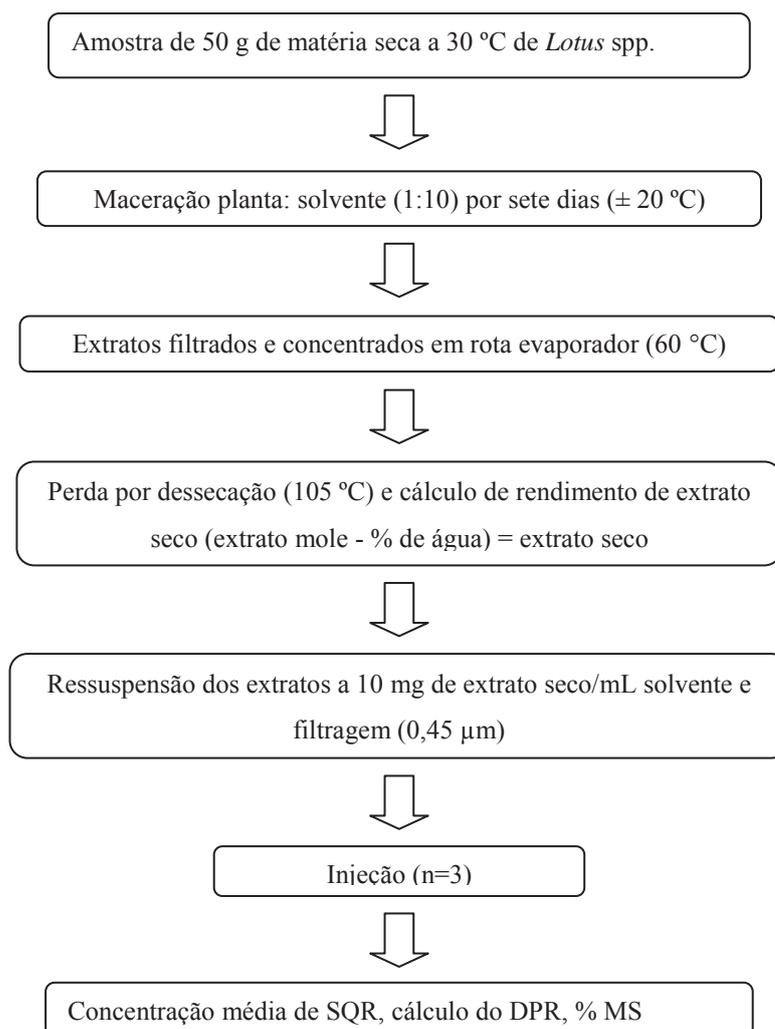


Figura 10. Fluxograma do procedimento experimental para análise de taninos e de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência em *Lotus* spp.

4 Resultados e discussão

4.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de taninos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência

4.1.1 Escolha do comprimento de onda

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de compostos implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como na sua eficiência na rotina do laboratório, e sua validação visa confirmar a confiabilidade de desempenho dos mesmos (ELOY et al., 2012). Neste estudo, a determinação de taninos e flavonoides foi realizada mediante CLAE, a qual necessita inicialmente da definição do comprimento de onda a ser utilizado, através de varredura na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) mostrando o máximo de absorção para cada composto.

A espectrofotometria é o método que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução. Para se obter informação sobre a absorção de uma amostra, ela é inserida no caminho óptico do espectrofotômetro, que mede o quanto de luz foi absorvida pela amostra. Desta forma a espectrofotometria permite selecionar o comprimento de onda da radiação adequado à análise de um determinado componente (SKOOG et al., 2002).

Os valores de absorbâncias (ABS) e os espectros UV/VIS obtidos através da análise espectroscópica mostraram os máximos de absorção de cada composto. Os espectros obtidos na faixa de 200 a

400 nm para rutina, quercetina, ácido gálico e canferol exibiram máximos de absorção em aproximadamente 260 nm, enquanto que catequina e epicatequina exibiram máximos de absorção em 280 nm (Figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16). Com esses resultados determinaram-se os comprimentos de onda a serem utilizados para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos.

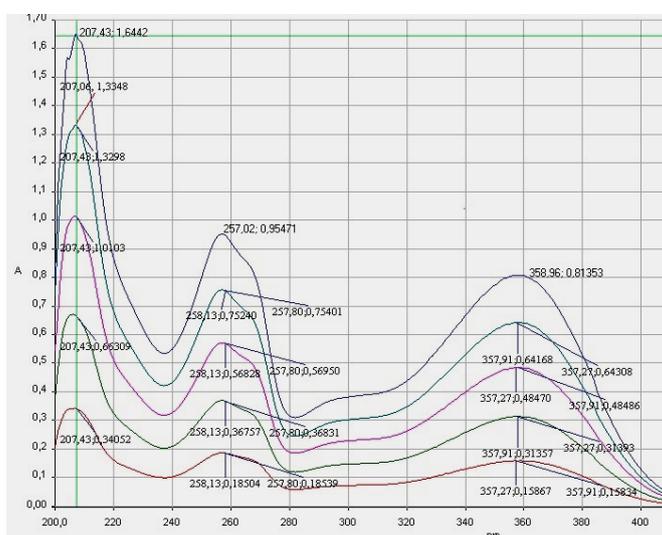


Figura 11. Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de rutina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; e 25,0 $\mu\text{g/mL}$).

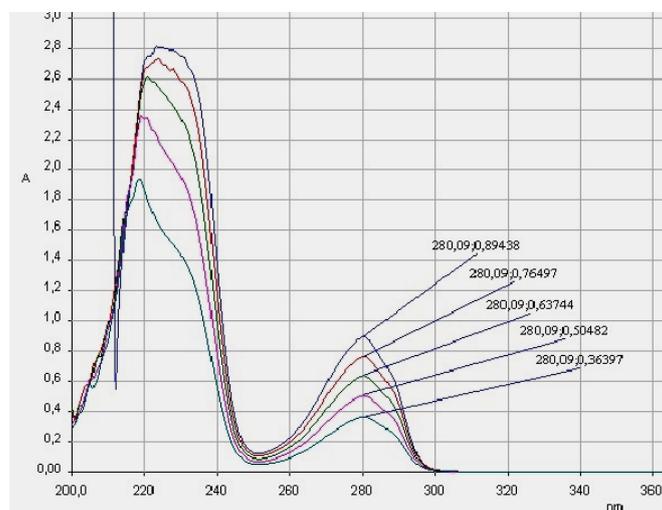


Figura 12. Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de catequina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (25,0; 35,0; 45,0; 55,0 e 65,0 $\mu\text{g/mL}$).

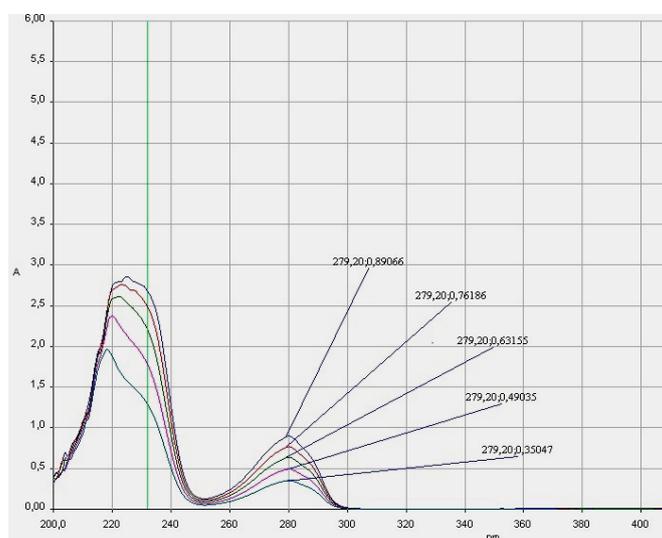


Figura 13. Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de epicatequina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (25,0; 35,0; 45,0; 55,0; e 65,0 $\mu\text{g/mL}$).

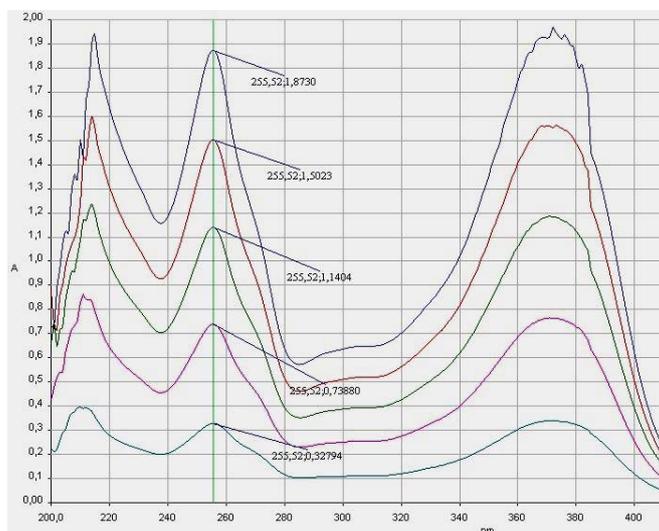


Figura 14. Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de quercetina em metanol em concentrações pré-estabelecidas (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; e 25,0 µg/mL).

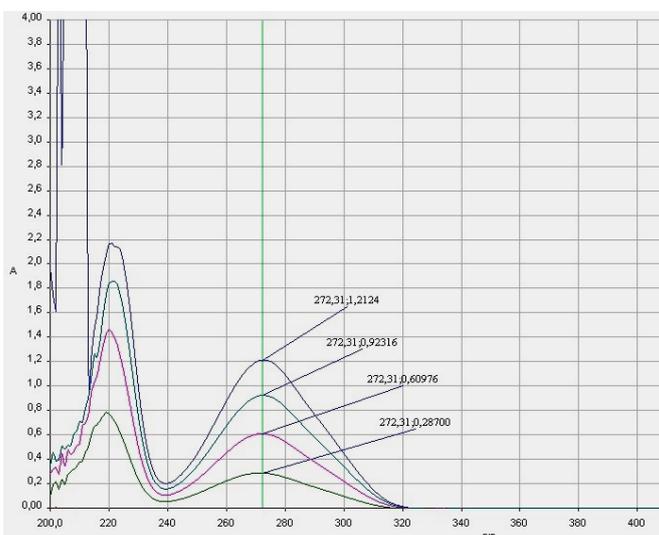


Figura 15. Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de soluções de ácido gálico em metanol em concentrações pré-estabelecidas (10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL).

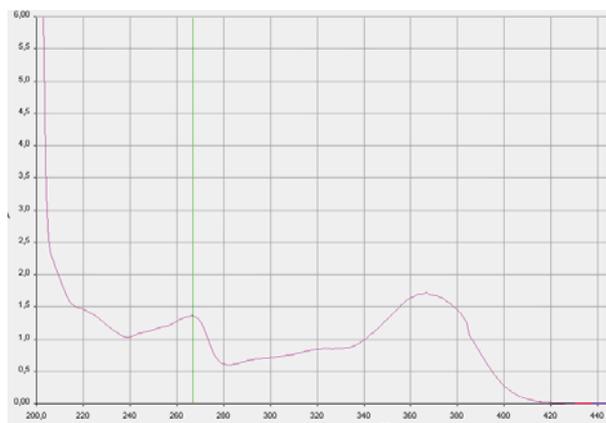


Figura 16 - Espectrofotometria de varredura (200 a 400 nm) de solução de canferol em metanol em concentração pré-estabelecida (20,0 $\mu\text{g/mL}$).

De acordo com os espectros obtidos para cada composto determinaram-se os comprimentos de onda e as possíveis concentrações a serem utilizadas para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos.

4.1.2 Desenvolvimento dos métodos cromatográficos

Para a obtenção das melhores condições cromatográficas, a fase móvel foi otimizada para melhor seletividade e sensibilidade em um curto tempo de separação para cada substância química de referência (SQR). Para isso investigou-se a composição mais adequada da fase móvel, testando sistemas compostos por metanol, água, acetonitrila e ácido fosfórico em diferentes proporções.

A melhor eluição dos picos, para todas as substâncias, foi alcançada com uma fase móvel constituída por acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico a pH 3 em diferentes proporções com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Nas condições otimizadas, o tempo de retenção de cada composto foram os seguintes: rutina: cerca de 8,1

min; catequina: 4 min; epicatequina: 5,1 min (acetonitrila: água acidificada 18:82); quercetina: 3,85 min (acetonitrila: água acidificada 45:55); ácido gálico: 3,7 min (acetonitrila: água acidificada 10:90); canferol 3,15min (acetonitrila: solução A, 30:70, v/v), sendo a composição da solução A: metanol: acetonitrila: água: ácido acético (40:15:45:2 v/v/v/v).

Os perfis cromatográficos das SQRs utilizadas nos presentes métodos desenvolvidos apresentam adequada separação dos compostos. Os cromatogramas típicos foram obtidos a partir de cada sistema desenvolvido. O único sistema de detecção simultânea utilizou-se dos padrões catequina, epicatequina e rutina (Figura 17). Para quercetina, ácido gálico e canferol foram desenvolvidos sistemas cromatográficos de detecção individual (Figuras 18, 19 e 20).

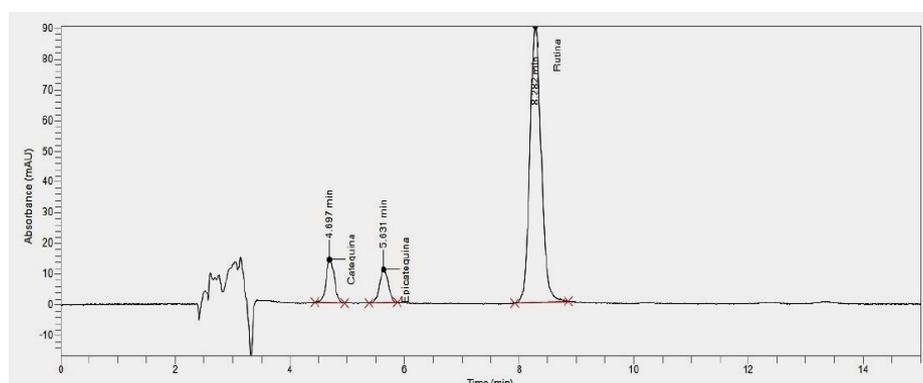


Figura 17. Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila: água (18:82 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de catequina, epicatequina e rutina (40 µg/mL).

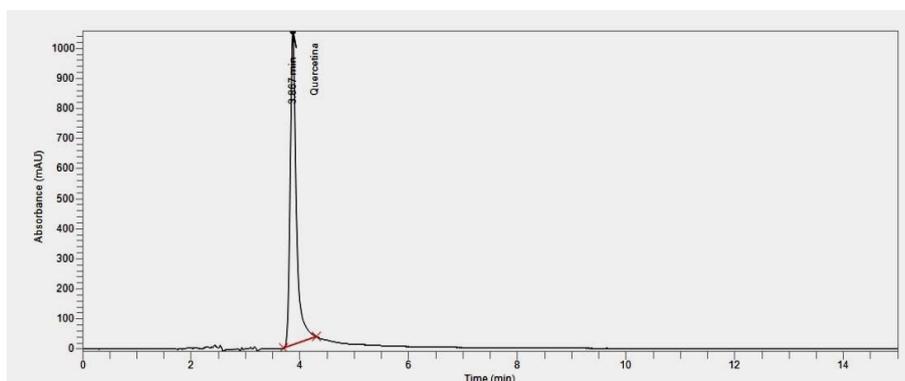


Figura 18. Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila:água (45:55 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de quercetina (40,0 µg/mL).

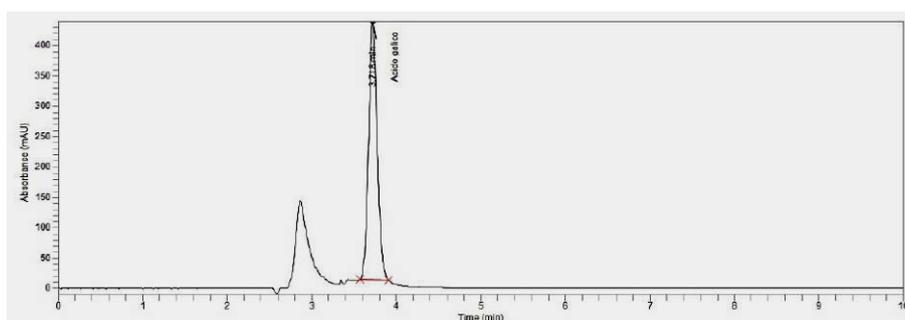


Figura 19. Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila:água (10:90 v/v) pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de ácido gálico (200,0 µg/mL).

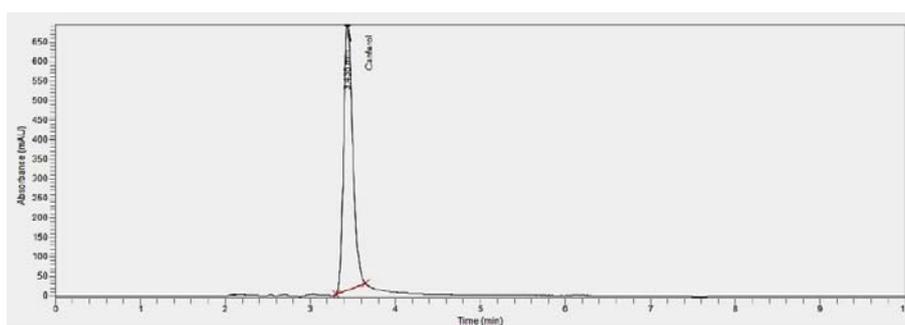


Figura 20. Cromatograma obtido utilizando fase móvel constituída por acetonitrila: solução A (30:70, v/v), pH 3,0 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 260 nm de canferol (100,0 µg/mL).

4.1.3 Validação do método

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Essas informações aplicam-se a técnicas analíticas que façam uso de métodos como a CLAE. Por meio de estudos experimentais, a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, apresentando especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

4.1.3.1 Linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A linearidade da resposta do detector foi calculada para as soluções das SQRs na faixa de 40 - 200 µg/mL. As equações obtidas a partir das retas e os coeficientes de correlação para cada SQR indicaram a linearidade das curvas de calibração (Tabela 5). Após a análise dos dados por regressão linear os valores das áreas obtidas mostraram ser diretamente proporcionais à concentração de cada SQR no intervalo avaliado, obtendo um coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 em todas as curvas de calibração, estando de acordo com o critério mínimo aceitável $\geq 0,99$ (BRASIL, 2003). A validade do

ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}} = 0,0001$; $P = 5\%$) e, entre as fontes de variação analisadas foi observado que houve regressão linear e diferença entre as concentrações, ou seja, quanto maior a concentração das soluções maior a resposta do detector, não havendo desvio de linearidade.

Tabela 5. Equações lineares e coeficientes de correlação das substâncias químicas de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol

SQR	Equação linear	Coefficiente de correlação
Catequina	$y = 8405x - 12519$	0,9967
Epicatequina	$y = 3695x + 19458$	0,9980
Rutina	$y = 31467x - 187644$	0,9997
Quercetina	$y = 45869x - 133333$	0,9938
Ácido gálico	$y = 30980x - 100613$	0,9992
Canferol	$y = 55977x - 134659$	0,9958

As curvas de calibração média obtidas no processo de validação dos sistemas desenvolvidos no CLAE para cada SQR foram plotadas automaticamente pelo software Chromera (Figuras 21, 22, 23, 24 e 25)

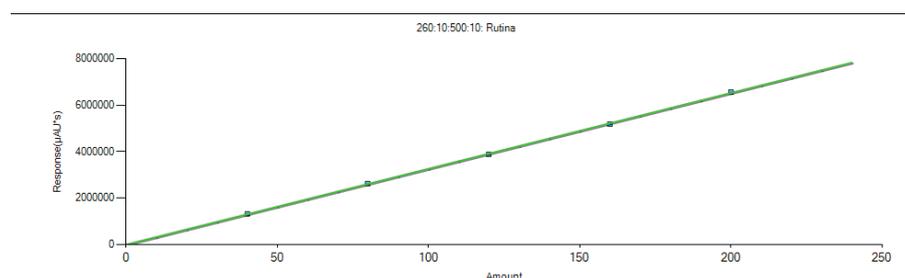


Figura 21. Curva de calibração média ($n=5$) da rutina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

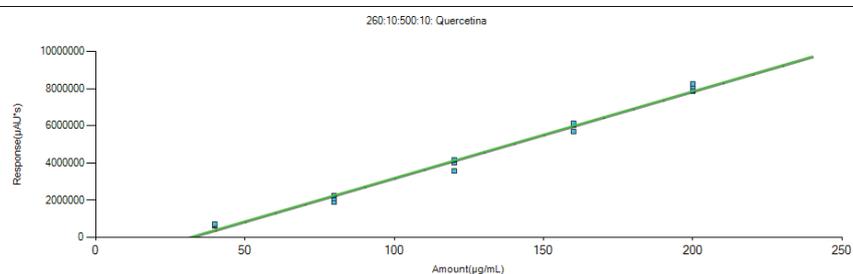


Figura 22. Curva de calibração média ($n=5$) da quercetina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

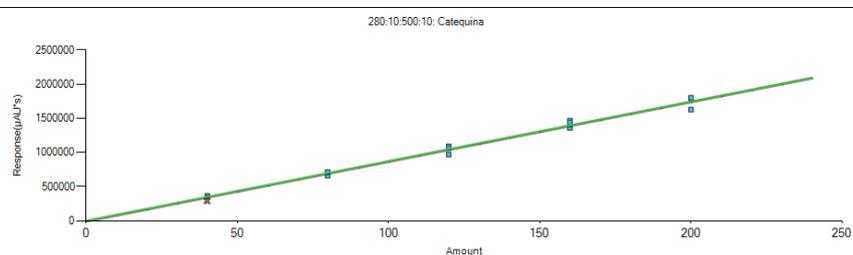


Figura 23. Curva de calibração média ($n=5$) da catequina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

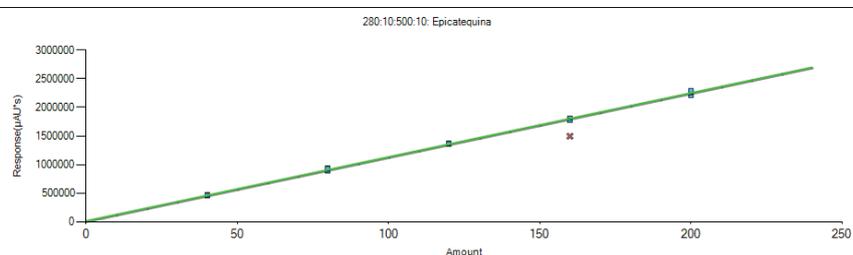


Figura 24. Curva de calibração média ($n=5$) da epicatequina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

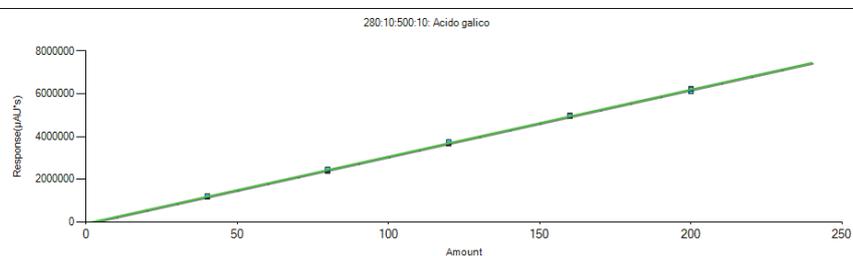


Figura 25. Curva de calibração média ($n=5$) do ácido gálico obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das equações 1 e 2 (pg.74) para cada composto e os valores obtidos indicaram a alta sensibilidade dos métodos (Tabela 6). O limite de quantificação, equivalente ao menor nível que poderá ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis foi distinto para cada composto.

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação dos métodos para cada substância química de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina, quercetina, ácido gálico e canferol

SQR	Limite de detecção	Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
Rutina	3,4	11,2
Quercetina	125,9	37,8
Catequina	1,9	6,4
Epicatequina	5,2	17,2
Ácido gálico	8,4	27,9
Canferol	8,2	27,4

4.1.3.2 Exatidão e precisão

Para a análise fidedigna do composto de interesse o método deve mostrar-se preciso, ou seja, apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração, e exato, representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005).

A exatidão (Tabela 7) e a precisão intra-dia (Tabelas 8), calculadas dentro do intervalo de linearidade obtido, mostraram valores com percentual de recuperação adequado para o estudo (próximos a 100%). Desta forma as metodologias desenvolvidas caracterizam-se por apresentarem-se exatas e precisas. O desvio

padrão relativo apresentou valores dentro do critério de aceitação de até 5 % (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 7. Estudos de exatidão das substâncias químicas de referência (SQR), catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol em soluções-padrão

SQR	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
Catequina	101	101,6	100,6	3,25
	141,4	141,1	99,8	1,64
	181,8	183,9	101,2	2,52
Epicatequina	101,6	100,5	98,9	1,41
	142,2	146,7	103,2	1,07
	182,9	187,7	102,6	1,31
Rutina	101,0	94,8	92,4	4,54
	141,4	131,3	91,5	4,70
	181,8	164,8	89,2	3,86
Quercetina	100,9	89,7	88,9	3,15
	141,3	129,9	92,0	4,91
	181,6	173,8	95,7	2,00
Ácido gálico	102,0	98,7	97,1	2,07
	142,0	137,0	96,3	3,02
	182,0	171,1	94,0	2,85
Canferol	45,0	45,6	101,3	2,96
	55,0	53,8	97,8	3,07
	65,0	63,3	97,3	0,83

D.P.R – Desvio padrão relativo

4.1.3.4 Especificidade e robustez

A especificidade do método foi comprovada para cada composto a partir da análise da pureza do pico através do detector de arranjo de diodos (PDA). Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico, por

exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos, são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

Tabela 8. Repetibilidade e precisão em soluções-padrão das substâncias químicas de referência (SQR) catequina, epicatequina, rutina e quercetina, ácido gálico e canferol

SQR	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (X ± D.P.R., n = 6) (µg/mL)	Percentual de recuperação (%)
Catequina	206,00	207,94 ± 2,70	100,91
Epicatequina	206,00	209,00 ± 2,42	101,48
Rutina	200,00	192,68 ± 1,19	96,34
Quercetina	206,00	208,08 ± 1,87	101,87
Ácido gálico	203,00	202,21 ± 0,76	99,51
Canferol	95,00	92,63 ± 1,41	97,51

D.P.R – Desvio padrão relativo.

Os métodos propostos foram considerados específicos, pois não apresentaram variação nos seus máximos de ABS e ausência de impurezas em diferentes regiões no CLAE/PDA.

Os métodos desenvolvidos também demonstraram robustez frente a pequenas alterações das condições analíticas. As alterações de pH e fluxo da fase móvel não alteraram os valores de concentrações e os cromatogramas que apresentaram apenas pequenas alterações no tempo de retenção das SQRs. Os métodos desenvolvidos suportaram as alterações a que foram submetidos, portanto são métodos robustos.

Os métodos desenvolvidos para análise de taninos e flavonoides utilizando a técnica de CLAE foram validados e

mostraram-se precisos, exatos, lineares, específicos, sensíveis e robustos. Portanto, as metodologias desenvolvidas são convenientes para serem utilizadas para a quantificação destes compostos (taninos e flavonoides) em extratos vegetais.

4.2 Aplicação da metodologia desenvolvida nos extratos vegetais

O perfil cromatográfico dos extratos de cornichão, cornichão anual e cornichão-dos-banhados em solos com calagem e sem calagem apresentaram separação adequada dos compostos utilizados para desenvolvimento dos métodos.

Os métodos para determinação de taninos e flavonoides utilizados neste trabalho demonstraram vantagens como a facilidade e a rapidez na preparação das amostras, na análise cromatográfica e a capacidade de quantificar taninos e flavonoides simultaneamente.

4.2.1 Taninos e flavonoides em *Lotus* spp. em função da acidez do solo

4.2.1.1 Taninos

A concentração de TC, também denominados de proantocianidinas (PA), estimada neste estudo em equivalentes de catequina (EC) e de epicatequina (EE), variou de 2,3 a 23,1 g TC/kg MS, dependendo do genótipo e da acidez do solo (Tabela 9). Esta faixa de concentração pode ser considerada baixa, já que entre 20 a 40 g/kg TC são comumente observadas em *Lotus* spp., enquanto que concentrações maiores que 60 g de TC/kg de MS são incomuns (KELMAN & TANNER, 1990).

A análise da variância mostrou efeito da interação genótipo x acidez do solo na concentração de TC (Tabela 9). Em ambos os níveis de acidez, observou-se diferença entre os genótipos, com maior amplitude (17,5 g de TC/kg de MS) de variação no solo mais ácido, em relação ao solo com maior pH (5,2 g de TC/kg de MS).

Em solo com maior acidez, destacou-se a população UFRGS, pelo maior teor de TC; e a cv. Serrano, pelo menor teor desses metabólitos. Nessa condição, não houve similaridade ($P < 0,05$) alguma entre os genótipos, inclusive entre os três representantes do cornichão. Nesse caso, o menor valor de TC foi verificado na cv. São Gabriel. Na Nova Zelândia, em ensaio de campo e utilizando vanilina acidificada como método de determinação de TC, Lowther et al. (1987) verificaram concentração de 0,29 g de TC/kg de MS na cv. São Gabriel, e entre 0,58 e 0,97 g de TC/kg de MS na cv. Maku (cornichão-dos-banhados). As diferentes condições de cultivo e de metodologia podem explicar, em parte, as divergências nos resultados dos trabalhos.

Para a cultivar brasileira de cornichão-dos-banhados, cv. Serrano, não há informações sobre a concentração de TC, o que limita a discussão dos resultados aqui obtidos, inéditos para este germoplasma.

Em solo corrigido, as diferenças entre os genótipos foram menores, com similaridade ($P > 0,05$) entre os cvs. São Gabriel e Serrano, pertencentes a espécies distintas. Assim como ocorreu no solo com maior acidez, os três representantes de cornichão mostraram diferenças significativas na concentração de TC. A cv. Ganador foi desenvolvido no Uruguai e, segundo Paim & Riboldi (1991), embora

não haja informação oficial sobre sua origem, acredita-se que seja derivado da cv. São Gabriel, o que explicaria a maior similaridade entre ambos os genótipos quanto ao teor de TC verificados neste estudo em relação ao verificado com a população UFRGS. Ao contrário do que ocorreu em solo com maior acidez, essa população mostrou o menor valor de TC dentre os genótipos de cornichão, enquanto o maior valor foi observado na cv. Ganador. Dentre todos os genótipos, o menor teor de TC foi evidenciado na cv. El Rincón. No estudo de Kelman & Tanner (1990), essa espécie apresentou valor muito superior (31,6 g de TC/kg de MS) em relação aos obtidos no presente trabalho, o que pode ser atribuído aos distintos métodos de quantificação de taninos, métodos de cultivo e manejo. No trabalho desses pesquisadores, o cultivo foi a campo, com duração de um ano, em solo com maior acidez com pH 4,3 e com teor de Al de 14,2 µg/g e solo corrigido com pH 5,2 e Al solúvel 0,3 µg/g.

Tabela 9. Concentração de taninos condensados, expressa em equivalente catequina e epicatequina (ECE), na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo

Espécie	Genótipo	pH _(água)	
		4,7	6,4
		----- g de TC/kg de MS-----	
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	11,6 cA	7,0 bB
	UFRGS	23,1 aA	5,3 cB
	Ganador	15,0 bA	7,5 aB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	5,6 eB	7,0 bA
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	9,0 dA	2,3 dB
Média		12,9	5,8
C.V. (%)		2,2	3,9

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Com exceção da cv. Serrano, todos os genótipos mostraram maior concentração de TC em solo com maior acidez, como era esperado. Nessa cultivar houve aumento de 25% na concentração de TC em solo corrigido, ao passo que nos demais genótipos a concentração de TC ficou entre 39,6% (cv. São Gabriel) e 77% (UFRGS).

Há unanimidade na literatura que condições restritivas ao crescimento das plantas induzem à elevação na síntese de metabólitos secundários. Neste trabalho, pode-se considerar que o principal fator de estresse foi o maior teor de Al do solo que não recebeu calcário. Nesse tratamento, a saturação por Al foi 20%, enquanto que no solo que recebeu calcário o valor deste atributo foi de 0% (Tabela 1). Segundo Chen et al. (2011), a exposição a elevadas concentrações de Al aumenta a quantidade de compostos fenólicos em plantas. Uma vez que estes compostos, como os taninos, podem reduzir o efeito tóxico de algumas substâncias químicas através da complexação com metais e da própria exsudação radicial, os taninos protegem as plantas contra a toxicidade do Al.

O incremento na produção de TC sob condições de estresse conferem tolerância ao Al de algumas espécies vegetais. Essas utilizam a liberação de compostos fenólicos que atuam na complexação do Al como um mecanismo de resistência contra Al (KIDD et al., 2001; BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002). Metais tóxicos no solo provocam uma intensa produção de metabólitos secundários seguida de dinâmica exsudação radicial (CHEN et al., 2011). A exudação de TC nas raízes a atuação deste compostos como agentes quelantes de Al caracteriza-se como a primeira estratégia

adotada pelas plantas para tolerar a toxicidade do Al (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002).

O expressivo aumento no teor de TC na população UFRGS verificado neste estudo evidencia a importância da determinação desse metabólito nos programas de melhoramento genético para tolerância ao Al. Esse genótipo foi selecionado para tal finalidade na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e, dentre três genótipos de cornichão (Draco, São Gabriel e UFRGS), Janke et al. (2010) destacaram a população UFRGS como o material com maior tolerância ao Al. Anteriormente, Pavlovkin et al. (2009) haviam observado que, dentre os mesmos genótipos, submetidos à redução do pH, de 5,5 para 4,0, houve maior inibição do crescimento radicular na cv. São Gabriel (33,6%) e menor na população UFRGS (25,8%). Por fim, Pal'ove-Balang et al. (2012) verificaram que a população UFRGS teve menor frequência de dano celular em relação à cv. Draco em condição de baixo pH e estresse por Al. Em ambos trabalhos há indicação de uma maior tolerância ao Al da população UFRGS quando relacionada a outros genótipos de cornichão, resultados pertinentes ao que foi encontrado no presente trabalho, em que esta população apresentou-se capaz de produzir maiores quantidade de TC em solo com maior acidez, do que os outros genótipos testados.

Quanto ao comportamento divergente da cv. Serrano ao ser submetido a solo com maior acidez, não há explicação plausível para o resultado com base nas variáveis analisadas, uma vez que todos os genótipos foram cultivados e colhidos simultaneamente, sempre no estágio vegetativo. Uma das possíveis causas a serem investigadas em futuros estudos é que, de acordo com Meagher et al. (2004) o

cornichão-dos-banhados possui maior proporção de prodelfinidina (PD= galocatequina e epigalocatequina) em relação a procianidina (PC= catequina e epicatequina). Nessa espécie, a relação de PC:PD foi estimada em 19:81, ao passo que para cornichão foi de 84:16. O mesmo foi verificado por Sivakumaran et al. (2006), que verificaram predominância de PD em cornichão-dos-banhados e PC em cornichão. Neste trabalho foi feita a análise de procianidina, o que pode ter subestimado os níveis de TC na cv. Serrano. No entanto, como se trata da primeira referência sobre TC para essa cultivar, não se pode descartar que, no processo de seleção, tenha ocorrido seleção involuntária para plantas com menor teor de taninos. Esta cultivar foi obtida a partir de seleção na cv. Maku, com o objetivo de obter plantas que florescessem e, portanto, formassem sementes nas condições de fotoperíodo do sul do Brasil.

Na média de genótipo, a concentração de TC foi maior em solo ácido, com elevação de 122%, em relação ao verificado em solo que recebeu calagem (Tabela 9). Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Kelman & Tanner (1990) não verificaram efeito do pH do solo na concentração de TC em *Lotus* spp., mas houve expressiva variação entre genótipos. Foram obtidos valores médios de 20,9 g de TC/kg de MS (cornichão), 31,6 g de TC/kg de MS (cornichão-anual) e 59,9 g de TC/kg de MS (cornichão-dos-banhados). Segundo os autores, a origem do genótipo e as diferenças na duração das fases fenológicas das espécies de *Lotus* spp. têm influência sobre os níveis de TC, sugerindo controle genético sobre o teor de taninos. É possível, no entanto, que no trabalho destes autores os níveis de pH não tenham

vido suficientemente distintos (pH 4,3 e 5,2) para promover alteração nos níveis de taninos.

Em geral, sob condição de estresse ocorre elevação das concentrações dos TC, o que poderia explicar, parcialmente, as baixas concentrações de TC encontradas nos genótipos aqui avaliados, pois, com exceção da acidez do solo, as plantas não foram sujeitas à restrição hídrica, fertilidade do solo ou herbivoria.

Segundo Waghorn et al. (1990), concentrações baixas de TC, como 1,70 g de TC/kg de MS, podem afetar a solubilidade da proteína no rúmen, mas valores entre 20 e 30 g de TC/kg de MS são considerados ideais, para maximizar o valor nutritivo de plantas forrageiras. Para Waghorn & Jones (1989), 11,3 g/kg MS de TC já possui efeito sobre digestão ruminal em bovinos e impede o timpanismo. Forrageiras contendo valores moderados de PA (20 a 40 g de TC/kg de MS) podem exercer efeitos benéficos no metabolismo de ruminantes, retardando a degradação da proteína em amônia no rúmen pelos microrganismos, aumentando, dessa maneira, a absorção dos aminoácidos no intestino. Porém, altas concentrações desses compostos (60 a 120 g de TC/kg de MS) reduzem o consumo voluntário, a eficiência digestiva e a produtividade animal (AERTS et al., 1999).

Os valores de TC em *Lotus* spp. referidos na literatura são muito variáveis, pois esse tipo de metabólito varia em relação ao genótipo, quanto ao ambiente em que as plantas são cultivadas e quanto à metodologia adotada. Níveis de TC tendem a ser baixos (=5 g de TC/kg de MS) em germoplasma oriundo da América do Norte e Ásia Menor, intermediários (25 g de TC/kg de MS) para o

germoplasma europeu, e altos (>40 g/kg MS) para aqueles materiais oriundos da região do Mediterrâneo (MacADAM et al., 2006).

John & Lancashire (1981) quantificaram concentrações entre 2,5 e 14,5 g de TC/kg de MS em cornichão. Barry & Manley (1984) constataram valores entre 46 e 106 g de TC/kg de MS em cornichão-dos-banhados. EHLKE & Le GARE (1993) estimaram entre 10 e 100 g de TC/kg de MS em genótipos de cornichão. Miller & Ehlke (1994), ao relacionar TC com a digestibilidade da MS, estimaram entre 25 e 85 g de TC/kg de MS em cornichão, o que já implicaria na redução da degradação da proteína ruminal. Wen et al. (2003) observaram teores entre 11,4 e 38,6 g de TC/kg de MS em cornichão cultivado em monocultura e em consórcio com festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.), respectivamente. Em *Lotus* spp., Sivakumaran et al. (2006) constataram entre 2 e 109 g de TC/kg de MS, sendo que o cornichão apresentou as menores concentrações, entre 13 e 55 g de TC/kg de MS, e cornichão-dos-banhados, de 29 a 64 g de TC/kg de MS. Em cornichão, Ramirez-Restrepo et al. (2004, 2006) quantificaram valores de TC entre 8,3 e 28,7 g de TC/kg de MS, ao passo que Haring et al. (2007) obtiveram entre 25 e 54 g de TC/kg de MS. Acuña et al. (2008) obtiveram níveis entre 47 e 76 g de TC/kg de MS.

No Brasil, apesar da importância do cornichão e do tempo em que a cv. São Gabriel foi desenvolvido na década de 50 (PAIM, 1988), as informações sobre TC nesse genótipo são restritas ao estudo de Moro et al. (2010), realizado no mesmo local em que o trabalho da dissertação foi desenvolvido, em solo fértil e sem estresse hídrico ou térmico. Os autores obtiveram teores de TC inferiores aos estimados

no trabalho, por meio de cromatografia em camada delgada. Em equivalente de ácido tânico, verificou-se nas cultivares de cornichão ARS 2520 e São Gabriel 0,05 e 2,0 g de TC/kg de MS, respectivamente, e nas cvs. Maku (cornichão-dos-banhados) e El Rincón foram constatados 0,34 e 1,67 g de TC/kg de MS, respectivamente. Embora tenham sido verificado estes baixos teores, a adição de polietilenoglicol, para verificar a ação biológica dos TC, mostrou que houve aumento na produção de gás, indicando possível ação sobre a solubilidade das proteínas.

Dados divergentes em relação à concentração de TC obtidas em diferentes trabalhos também podem ser devido às diferenças de composição e das formas estruturais destes compostos (HEDQVIST et al., 2000). No trabalho, o principal componente de TC avaliado foi a epicatequina, cujo teor médio foi de 9,6 g de TC/kg de MS, em solo com maior acidez; e de 3,8 g de TC/kg de MS, em solo com pH corrigido (Tabela 10).

Em solo com maior acidez, o maior teor de catequina foi obtido na população UFRGS, ao passo que, em solo com pH corrigido, esse genótipo mostrou o menor teor deste composto. Isso também foi observado em relação ao teor de epicatequina, com exceção do solo com pH corrigido, em que não se detectou catequina na cv. El Rincón. Tal como ocorreu com a concentração de TC totais, os teores de catequina e de epicatequina de todos os genótipos, exceto a cv. Serrano, reduziram com a elevação do pH do solo (Tabelas 9 e 10).

Tabela 10. Concentração de catequina e epicatequina na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo

Espécie	Genótipo	pH	
		4,7	6,4
Catequina (g/kg de MS)			
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	2,7 dA	2,5 aB
	UFRGS	5,9 aA	1,4 dB
	Ganador	3,3 bA	1,7 cB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	1,8 eB	2,0 bA
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	3,0 cA	2,3 abB
Média		3,3 A	1,9 B
C.V. (%)		1,1	5,4
Espécie	Genótipo	Epicatequina (g/kg de MS)	
		4,7	6,4
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	9,0 cA	4,5 bB
	UFRGS	17,2 aA	4,0 cB
	Ganador	11,7 bA	5,7 aB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	3,8 eB	4,9 bA
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	6,1 dA	0,00 dB
Média		9,6 A	3,8 B
C.V. (%)		1,5	2,3

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

A maior variação dos teores dos compostos avaliados, obtidos entre os dois níveis de acidez e genótipos testados, foi observada com a concentração de epicatequina, principal componente dos TC avaliados neste estudo (Figura 26).

A população UFRGS se destacou pela expressiva variação da concentração de catequina e epicatequina na matéria seca da parte aérea das plantas cultivadas em solo com maior acidez (Figura 26). No entanto, entre os demais genótipos de cornichão (Ganador e São Gabriel), as diferenças mais evidentes foram quanto à variação de epicatequina. Nas plantas de Ganador e São Gabriel, a concentração desse composto dobrou no tratamento com menor pH. Na cv. Serrano,

a principal variação também ocorreu na epicatequina, com redução de 22%, no tratamento com menor pH do solo. Porém, a maior variação encontrada foi na cv. El Rincón, no qual não houve detecção de epicatequina nas plantas cultivadas em solo que recebeu calcário.

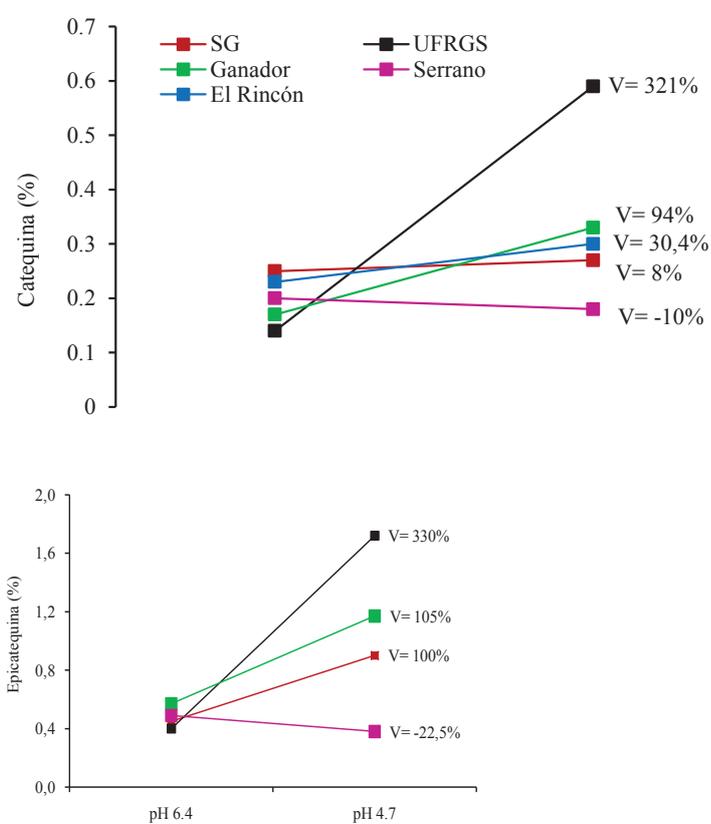


Figura 26. Variação (V) na concentração de catequina e epicatequina na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.

Analisando a contribuição dos dois componentes na formação dos TC em *Lotus* spp., a epicatequina foi, em geral, o composto predominante, com média de 57,3 e 72,9%, em plantas cultivadas em solo como maior e menor pH, respectivamente. A exceção foi a ausência desse componente na cv. El Rincón, no solo com pH corrigido (Tabela 10). A maior proporção de catequina foi observada na cv. El Rincón, em ambos os níveis de acidez, sendo que em solo com pH 6,4, esse componente foi o único a contribuir para os TC. Entre os genótipos de cornichão, a proporção de catequina e epicatequina teve maior variação no tratamento com o solo corrigido. Em solo com maior acidez, os teores de TC do São Gabriel e do Ganador não diferiram, mas o contrário foi observado em pH 6,4 (Tabela 1).

Os genótipos mostraram, à semelhança do que ocorreu nos TC totais (Tabela 11), comportamento distinto nas proporções de catequina e epicatequina, em resposta ao pH do solo. Na população UFRGS não houve variação na proporção dos teores de catequina e epicatequina nos dois níveis de acidez, com média de 25% e de 75%, respectivamente. Nas duas cultivares de cornichão, Ganador e São Gabriel, e na cv. El Rincón, o cultivo em solo com maior acidez promoveu redução na proporção de catequina. O oposto foi observado na cv. Serrano, em que este componente foi incrementado nessa condição de pH. Portanto, a proporção de epicatequina mostrou resposta contrária, com elevação na cv. Serrano e redução nas demais cultivares, com exceção de UFRGS, em solo corrigido.

Gruber et al. (2008) obtiveram variações no tamanho de polímeros de proantocianidinas na composição de TC em *Lotus* spp.,

mencionando valores entre 0 e 41 g de TC/kg de MS entre 31 genótipos. Os autores destacaram que o fato da distinta composição de TC está relacionado aos aspectos tridimensionais das subunidades que os compõe, de seus padrões de hidroxilação e de transcrição genética. Sivakumaran et al. (2006), verificando a variação de proantocianidinas em *Lotus* spp., encontraram catequina como sendo a unidade final de TC mais comum entre as espécies, mas, em cornichão, a epicatequina foi a unidade de extensão de TC dominante, o que concorda com os resultados obtidos neste estudo. No entanto, os autores verificaram que, em cornichão-dos-banhados, foram encontradas maiores variações nas unidades de extensão de TC, sendo que a unidade predominante foi a epigalocatequina. O cornichão-dos-banhados diferiu das outras espécies analisadas, não apenas pelas maiores concentrações de TC, mas pela estrutura, dispersão, fracionamento e composição dos monômeros de TC.

Neste estudo, a epigalocatequina não foi avaliada, o que limita a comparação dos estudos, mas remete à importância da continuidade dos trabalhos com essa espécie a fim de determinar a composição dos TC e sua variação em solos com distinta acidez.

A razão entre as concentrações de epicatequina e catequina observadas nos genótipos de *Lotus* spp. (Figura 27) resume e ilustra a variabilidade fitoquímica no gênero quanto à composição dos taninos. Destaca-se a variabilidade intraespecífica em cornichão, com maior variação na cv. São Gabriel cultivado em solo com maior acidez. Da mesma forma, salienta-se a presença de epicatequina na composição de TC na cv. El Rincón quando cultivado em solo com maior acidez e a ausência desse composto nas plantas cultivadas em

solo corrigido. De forma similar, a redução da razão EP:C observada na cv. Serrano, cultivado em solo com maior acidez, divergiu do que foi observado nos genótipos de cornichão (Figura 27).

Tabela 11. Contribuição percentual de catequina e epicatequina na formação dos taninos condensados totais (TC) na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo

Espécie	Genótipo	pH	
		4,7	6,4
Catequina (% nos TC)			
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	23,1 cB	35,7 bA
	UFRGS	25,5 bA	25,9 dA
	Ganador	22,0 cB	23,0 eA
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	32,1 aA	29,0 cB
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	32,5 aB	99,09 aA
Média		27,1	42,7

Espécie	Genótipo	pH	
		4,7	6,4
Epicatequina (% nos TC)			
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	76,9 aA	64,3 dB
	UFRGS	74,5 bA	74,1 bA
	Ganador	78,0 aA	77,0 aB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	67,9 cB	71,0 cA
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	67,5 cA	0,91 eB
Média		72,9	57,3

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As diferenças observadas na concentração de TC entre os genótipos de *Lotus* spp. destacam a importância do fator genotípico como causa da variabilidade, bem como o efeito da acidez do solo na concentração dos taninos totais e dos componentes avaliados. A variabilidade intra e interespecífica de tais componentes em *Lotus* spp.

destaca, igualmente, a importância da análise de taninos e de seus componentes em programas de melhoramento genético.

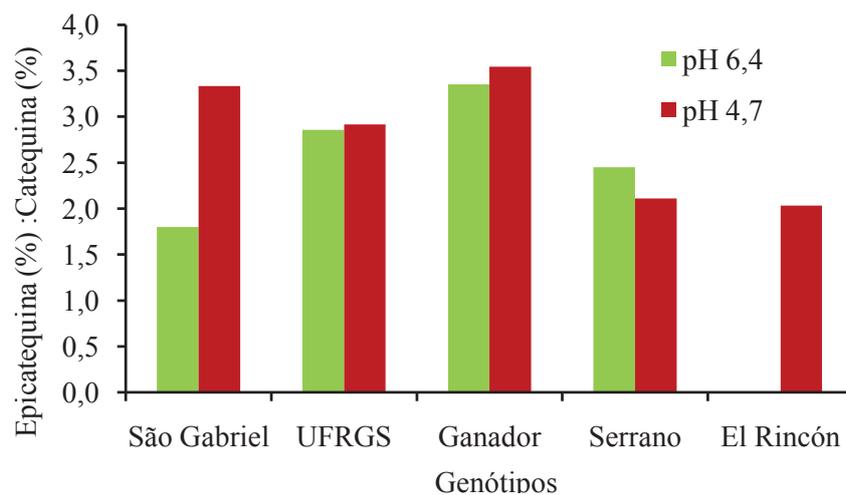


Figura 27. Razão entre concentrações de epicatequina e catequina na parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo.

4.2.1.2 Flavonoides

Para Reynaud & Lussignol (2005), há indícios de que o cornichão possui riqueza e diversidade de flavonoides e que o estudo de tais substâncias pode ser utilizado em investigações sobre a especiação do complexo cornichão ou da variação de flavonoides. Segundo Ceruti et al. (1972), o conteúdo de flavonoides em *Lotus* spp. é derivado da quantidade e qualidade da radiação recebida pelas plantas em função da altitude do local de cultivo. Para Reynaud & Lussignol (2005), plantas com diversidade e riqueza de polifenóis são encontradas em baixas latitudes, enquanto que em altas altitudes a instabilidade ambiental determina um conteúdo polifenólico pobre e homogêneo. No entanto, neste trabalho, as condições ambientais

foram as mesmas para todas as espécies, o que demonstra o efeito genético e a resposta do germoplasma à acidez do solo na concentração dos flavonoides.

Entre os compostos flavonoides analisados no trabalho, foram identificados rutina e quercetina, não sendo detectados ácido gálico e canferol. A concentração destes compostos variou de 0 a 3,1 g/kg de MS, dependendo do genótipo e do nível de acidez do solo (Tabela 12). Apesar de encontrarem-se diversos dados qualitativos sobre flavonoides em *Lotus* spp., que indicam a importância do gênero como fonte de metabólitos com atividade biológica, não foram encontrados dados quantitativos sobre estes compostos na literatura.

A análise da variância mostrou efeito da interação genótipo x acidez do solo na concentração de rutina e de quercetina (Tabela 12). Em ambos os níveis de acidez, observou-se diferença entre os genótipos, com maior amplitude média (1,45 g de flavonoides/kg de MS) de variação no solo mais ácido, em relação ao solo com maior pH (1,0 g de flavonoides/kg de MS).

A diferença entre as espécies e os genótipos indica variabilidade intra e interespecífica do fator germoplasma. Em todos os genótipos, as maiores concentrações de rutina foram verificadas em solo mais ácido, com os maiores teores verificados na população UFRGS. Já os teores de quercetina da cv. São Gabriel e do cornichão anual não diferiram entre os dois níveis de acidez do solo. Em ambas cultivares registrou-se um aumento de quercetina de 0,01%, com o aumento do pH do solo. Metais tóxicos no solo provocam uma intensa produção de metabólitos secundários seguida de exsudação radical, que aumentam a biodisponibilidade de nutrientes potencialmente

neutralizadores de metais tóxicos no solo. Esta plasticidade no comportamento bioquímico pode maximizar a captura de nutrientes e minimizar custo de carbono para a planta (METLEN et al., 2009; CHEN et al., 2011). A exudação de flavonoides e sua atuação como agentes quelantes de Al caracterizam-se como a primeira estratégia adotada pelas plantas para tolerar a toxicidade do Al.

Tabela 12. Concentração de flavonoides (rutina e quercetina) na matéria seca da parte aérea (folha+caule) de genótipos de *Lotus* spp. cultivados sob distintos níveis de acidez do solo

Espécie	Genótipo	pH	
		4,7	6,4
Rutina (g/kg de MS)			
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	1,9 cA	1,6 aB
	UFRGS	3,1 aA	1,0 bB
	Ganador	2,5 bA	1,6 aB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	0,8 eA	0,1 dB
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	1,0 dA	0,9 cB
Média		1,9	1,0
C.V. (%)		52,5	59,5
Quercetina (g/kg de MS)			
<i>L. corniculatus</i>	São Gabriel	0,6 cA	0,5 aA
	UFRGS	1,0 aA	0,0 cB
	Ganador	0,7 bA	0,4 abB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	0,5 cdA	0,0 cB
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	0,4 dA	0,3 bA
Média		0,6	0,2
C.V. (%)		35,9	95,9

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na média dos genótipos avaliados, o teor de rutina foi maior que o de quercetina (Tabela 12). A maior concentração desse flavonoide foi de 3,1 g/kg de MS, ao passo que a de quercetina foi de 1,6 g/kg de MS. A exsudação de rutina e de catequina, induzida por

altas concentrações de Al, foi observada por Vásquez et al. (1999), em milho. Como mencionado, a tolerância do Al está relacionada com o teor de flavonoides das plantas. Assim, é possível que a maior síntese destes compostos da população UFRGS possa explicar, parcialmente, a maior tolerância ao Al, em relação a outros genótipos de cornichão (SANTOS et al., 2008; JANKE et al., 2010; PAVLOVKIN et al., 2009; PAL'OVE-BALANG et al., 2012).

Porém, além de rutina e quercetina, outros flavonoides têm sido detectados em *Lotus* spp. Moro et al. (2010) observaram a presença de vitexina, além de rutina, na cv. São Gabriel. Koelzer et al. (2009) evidenciou canferitrina, ácido oleanólico e β -sitosterol nessa mesma cultivar, em que ficou comprovada a sua atividade anti-inflamatória e antibacteriana em testes com leucócitos. Em sementes e exsudatos de raízes de cornichão-dos-banhados, Steele et al. (1999) detectaram naringenina, canferol, quercetina e apigenina. Ferraro et al. (2010), investigando o perfil de flavonoides de populações de *L. tenuis*, coletadas em diferentes locais, detectaram quercetina, canferol e isoramnetina. Apenas populações oriundas de uma planície salino-sódica inundada, pobre condições de solo mostraram canferol 7-metil éter e quercetina 7-metil-éter. Os últimos compostos podem, portanto, ser considerados a expressão de uma adaptação bioquímica e sugerem uma diferenciação ecótipo. Para *L. tenuis*, o canferol foi encontrado e isolado em caules de plantas apenas em estágio vegetativo (STRITTMATTER et al., 1991), indicando o efeito da fenologia. Basualdo et al. (2003) identificaram canferol, quercetina e isoramnetina em populações de *L. glaber*, sendo que a população oriunda de San Vicente, Argentina, não mostrou quercetina, mas

apresentou maiores concentrações de isoramnetina, o que sugeriu um possível controle genético sobre tal fator.

Esses estudos demonstram a diversidade em flavonoides em *Lotus* spp., indicando serem espécies com enorme possibilidade de pesquisa para tais compostos, que podem ser utilizados para diversas finalidades terapêuticas anticarcinogênicas, antiinflamatórias, antialérgicas, antiulcerogênicas, antivirais entre outras (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

4.2.2 Taninos condensados e flavonoides de *L. corniculatus* cv. São Gabriel presente em área ruderal

Entre os compostos avaliados no cornichão São Gabriel, o canferol e o ácido gálico foram os únicos não detectados. Isso discorda de Reynauld & Lussignol (2005), que afirmaram que o cornichão é rico em compostos derivados de canferol e quercetina. No entanto, estas discrepâncias podem estar associadas à estrutura destas substâncias. O canferol e o ácido gálico possuem estrutura altamente hidroxilada e apresentam alta eficiência na captação de radicais livres (AMIC et al., 2003; JACQUES et al., 2010). A estrutura hidroxilada causa maior disponibilidade para reações de oxidação e reduções e consequentes alterações na estrutura química do metabólito impedindo sua detecção na CLAE. Neste mesmo contexto, Jacques et al. (2010) observaram que o ácido gálico apresentou uma das maiores degradações dentre os compostos fenólicos analisados explicada por sua estrutura hidroxilada com alta capacidade de captar radicais livres.

As concentrações brutas de taninos condensados e seus componentes, de rutina e de quercetina em folha+caule foram maiores no estágio reprodutivo que no estágio vegetativo (Tabela 13). A concentração de TC em *Lotus* spp. depende do estágio de desenvolvimento da planta (GEBREHIWOT et al., 2002). Ela é similar dentro e entre períodos de crescimento, porém a menor concentração encontrada em épocas jovens pode estar correlacionada à menor produção de metabolitos secundários (EHLKE & LE GARE, 1993). Na fase de desenvolvimento inicial, uma grande proporção da biomassa adquirida é aplicada na produção de folhas, ricas em taninos, enquanto que, mais tarde, há aumento na proporção de biomassa investida em haste e raiz, pobres em taninos. Nas plantas em estágio vegetativo, a concentração de taninos é resultante dos efeitos antagônicos de síntese de taninos e de diluição por acúmulo de material não tanífero (HARING et al., 2007). Porém, estes autores não encontraram evidências de que o período vegetativo esteja correlacionado a baixas defesas e conseqüentemente a baixas concentrações de aleloquímicos.

Além do estágio fenológico, a concentração de taninos e flavonoides varia entre as partes das plantas (GARCÍA, 2004). Já, o padrão de distribuição de TC e flavonoides que determina esta diferença, varia entre espécies (GEBREHIWOT et al., 2002). A distribuição desigual entre componentes ocorre devido às mudanças na proporção de biomassa e resultam em variáveis proporções de órgãos vegetais com diferentes concentrações de metabólitos. A alocação de biomassa determina a diferença na concentração de

metabolitos e também a mudança na dinâmica de acúmulo durante as estações do ano (HARING et al., 2007).

Tabela 13. Teores médios (\pm desvio padrão) de catequina, epicatequina, taninos condensados totais, rutina e quercetina de distintas frações de plantas de cornichão cv. São Gabriel colhidas em estágio vegetativo e reprodutivo

SQR	Estádio fenológico		
	Vegetativo	Reprodutivo	
	Folha+caule	Folha+caule	Flor+fruto
----- (g/kg de MS \pm D.P) -----			
<i>Taninos</i>			
Catequina	1,4 \pm 0,07	2,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,07
Epicatequina	6,1 \pm 0,09	6,6 \pm 0,4	11,6 \pm 0,02
Taninos totais	7,5 \pm 0,08	8,7 \pm 0,25	12,8 \pm 0,045
<i>Flavonoides</i>			
Rutina	0,7 \pm 0,02	1,0 \pm 0,01	2,2 \pm 0,07
Quercetina	0,2 \pm 0,02	0,3 \pm 0,004	1,3 \pm 0,002

D.P. = desvio padrão.

No estágio reprodutivo, as concentrações de TC e flavonoides na fração “folha+caule” foram superiores (média=16,3 g de TC/kg de MS) ao que se verificou no estágio vegetativo (média=10,0 g de TC/kg de MS) A fração “flor+fruto” apresentou 120% mais rutina, 333% vezes mais quercetina, 76% mais epicatequina e 47% mais TC em relação à fração “folha+caule” (Tabela 13). Segundo Morris et al. (1993), a maior concentração de taninos em cornichão está localizada em flores, em particular, nas pétalas. Nas folhas, os taninos estão localizados no sistema vascular das folhas, distribuídos desde o pecíolo à ponta das folhas pela nervura central. Os resultados da Tabela 13 estão de acordo com

Gobbo-Neto & Lopes (2007), pois estes autores afirmam que os diferentes órgãos vegetais podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes destes metabólitos.

As flores são, geralmente, os órgãos que possuem as maiores concentrações de taninos e os tecidos caulinares, as menores (GEBREHIWOT et al., 2002), conforme verificado no trabalho (Tabela 13). Em geral, taninos são mais abundantes nas partes da planta que estão mais disponíveis aos herbívoros. Da mesma forma, a maior concentração de compostos fenólicos durante o florescimento é devido ao crescimento das plantas ser menor, em relação ao estágio vegetativo, o que faz com que o excesso de carbono fique disponível para síntese desses metabólitos (FRUTOS et al., 2004).

Para Strittmatter et al. (1991), a produção de flavonoides, em *Lotus tenuis*, pode estar ligada a mecanismos de diferenciação tissular e desta forma deduz-se que em distintos órgãos, com diferentes organizações teciduais, encontrar-se-ão distintos padrões e quantidades de taninos e flavonoides. Comparando os perfis de flavonoides de flores, caules, folhas e sementes secas de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, Suzuki et al (2008) concluíram que o acúmulo de flavonoides em plantas é regulado espacialmente e segue um padrão tecido-dependente. As flores possuem o perfil de flavonoides mais complexo entre flores, caules e folhas, contendo trinta flavonoides específicos.

5 Conclusões

1. A concentração de TC e flavonoides varia entre genótipos de *Lotus* L. e partes das plantas, sendo afetada pelo pH do solo e estágio fenológico.
2. Em *Lotus* spp. há variabilidade intra e interespecífica para o conteúdo de TC e flavonoides, o que permite a identificação de genótipos para programas de melhoramento genético.
3. Em estágio reprodutivo as concentrações de TC e flavonoides encontradas em folha+caule de cornichão cv. São Gabriel são superiores do que em estágio vegetativo. Flores e frutos apresentam mais flavonoides e taninos quando comparados a folhas e caules.
4. A proporção de precursores de taninos condensados catequina eepicatequina é variável em relação à espécie, componente vegetal, estágio fenológico e condições edáficas.
5. Em solo ácido, a população UFRGS, de *L. corniculatus*, apresenta maior concentração de taninos condensados e flavonoides em relação às cultivares São Gabriel e Ganador da mesma espécie.

Referências

ACUÑA, H.; CONCHA, A.; FIGUEROA, M. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. *Chilean Journal of Agricultural Research*, Santiago do Chile, v. 68, n. 1, p. 31-41, 2008.

ADAMSON, G. E.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; PRIOR, R. L.; CAO, G.; JACOBS, P. H.; KREMERS, B. G.; HAMMERSTONE, J. E.; RUCKER, R. B.; RITTER K. A.; SCHMITZ, H. H. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 47, n.10, p. 4184-4188, 1999.

AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; McNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Zurich, v. 75, n. 1, p. 1-12, 1999.

AOKI, T.; AKASHI, T.; AYABE, S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis, *Journal of Plant Research*, Tokyo, v. 113, n. 4, p. 475-488, 2000.

AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIC, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoides. *Croatica Chemica Acta*, Zagreb, v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.

ANURAGA, M.; DUARSA, P.; HILL, M. J.; LOVETT, J. V. Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, Sidney, v. 44, n. 7, p. 1667-1681, 1993.

ARAMBARRI, A. M. Illustrated catalogue of *Lotus* L. seeds (Fabaceae). In: BEUSELINCK, P. R. (Ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 21-41.

ARMSTRONG, C. S. Grasslands Maku' tetraploid lotus (*Lotus pedunculatus* Cav.). *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, Auckland, v. 2, n. 4, p. 333-336, 1974.

AYALA, W.; BERMÚDEZ, R. Caracterização produtiva de melhoramentos de campo em base a *Lotus* El Rincón e *Lotus* Maku. In: JORNADA DE UTILIZACIÓN DE MEJORAMIENTOS DE CAMPO EM LA ZONA ESTE DEL PAÍS, 33. 2001. (Informações).

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, Paris, v. 48, n. 1, p. 75-92, 2002.

BARRIOS, E.; BERMÚDEZ, R.; SERRÓN, N.; AYALA, W. Productividad de mejoramientos de campo con *Lotus subbiflorus* El Rincón y *Ornithopus pinnatus* INIA Molles. In: REUNIÓN TÉCNICA: FERTILIZACIÓN EN PASTURAS SERIE ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN, 631, 2010, Montevideo.

BARRY, T. N.; MANLEY, T. R. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v. 51, n. 3, p. 493, 1984.

BARRY, T. N.; FORSS, D. A. The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertilizer application, and effect on protein solubility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 34, n. 10, p.1047-1056, 1983.

BASUALDO, N.; QUINTANA, E.; MENDOZA, R.; DEL PERO MARTÍNEZ, M. A. Quimiosistemática en ecotipos de *Lotus glaber* (Fabaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, Buenos Aires, v. 38, p. 204, 2003.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. In: FLORKIN, M., MASON, H. S. (Eds.). *Flavonoid compounds*. New York: Academic Press, 1962. p. 75-809.

BLUMENTHAL, M. J.; MCGRAW, R. L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 97-120.

BOHNEN, H.; MEURER, E. J.; BISSANI, C. A. Solos ácidos e solos afetados por sais. In: MEURER, E.J. (Ed.) *Fundamentos de química do solo*. 3 ed. Porto Alegre: Genesis, 2006. p. 163-180.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução Executiva No. 899 de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em Jan/2013.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 54, n. 20 p. 7481-7487, 2006.

BRUNETON, J. *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2001. 1099p.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Washington, v. 20, n. 21, p. 3229–3235, 2006.

CARÁMBULA, M.; AYALA, W.; CARRIQUIRY, E. *Lotus pedunculatus: Adelanto sobre uma forrajera que promete*. INIA Treinta y Tres: Montevideo. 1994 a. 13p. (Serie Técnica 45).

CARÁMBULA, M.; CARRIQUIRY, E.; AYALA, W. *Lotus subbiflorus cv. El Rincón*. INIA - Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria: Montevideo, 1994b. 23p. (Serie Técnica 44).

CARTER, E.; THEODOROU, M.; MORRIS P. Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 2. Effect of elevated CO₂, temperature and drought on tissue digestion in relation to condensate tannin and carbohydrate accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 79, n. 11, p. 1431-1440, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHEKNKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Coord.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 1102p.

CERUTI, A.; FIUSSELLO, N.; LUPPI MOSCA, A. M. Flavonoids in *Lotus corniculatus* petals in relation to altitude. *Atti Convegno Lincei de Scienze fisiche*, Roma, v. 106, n.1, p. 333-350, 1972.

CHEN Y. M.; TSAO, T. M.; LIU, C. C.; LIN, K. C.; WANG, M. K. Aluminium and nutrients induce changes in the profiles of phenolic substances in tea plants (*Camellia sinensis* CV TTES). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 91, n. 6, p. 1111-1117, 2011.

CHENG, S.; QIU, F.; HUANG, J.; HE, J. Simultaneous determination of vitexin-2''-O-glucoside, vitexin-2''-O-rhamnoside, rutin, and hyperoside in the extract of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) leaves by RP-HPLC with ultraviolet photodiode array detection. *Journal of Separation Science*, Weinheim, v. 30, n. 5, p. 717-721, 2007.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. CQFSRS/SC. *Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina*. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2004. 400p.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1118p.

DAVYT, M.; IZAGUIRRE, P. *Lotus* Linnaeus. In: IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R (Eds.). *Legumes in Uruguay and neighboring regions*. Part I Papilionoideae (Faboideae), 1 ed. Montevideo: Ed Hemisferio Sur, 1997. p. 314-327.

DETTENBORN, G. R. Investigação de isoflavonas em espécies de leguminosas nativas do sul do Brasil, com ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart. 2009. 123p. Mestrado. Faculdade de Farmácia/ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFRGS, Porto Alegre, 2009.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Science*, Cambridge, v. 4, n. 10, p. 394-400, 1999.

DIXON, R. A.; XIE, D. Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?, *New Phytologist*, Lancaster, v. 165, n. 1, p. 9–28, 2005.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio:efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético, *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

EHLKE, N. J.; Le GARE, D. G. The effects of temperature and soil stresses on the production of tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 24, 1993.

ELIAS, C. O.; CHADWICK, M. J. Growth characteristics of grass and legume cultivars and their potential for land reclamation. *Journal of Applied Ecology*, London, v. 16, n. 2, p. 537-544, 1979.

ELOY, J. O.; DE OLIVEIRA, E. C. V.; MAROTTA-OLIVEIRA, S. S. A.; SARAIVA, J.; MARCHETTI, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. *Química Nova*, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1036-1040, 2012.

EPAGRI Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Lotus serrano: nova alternativa para o melhoramento do campo nativo ou para o plantio convencional. In: *Sementes e Mudas*. Disponível em:<http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=171&Itemid=109> Acesso em Jan/2013.

ESCARAY, F.; ESTRELLA, J.; PESQUEIRA, J.; PIECKENSTAIN, F.; DAMIANI, F.; PAOLOCCI, F.; RUIZ, O. R. Taninos condensados em leguminosas del género *Lotus*. *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 37, n.1, p. 34-35, 2007.

FERRARO, G.; FILIP, R.; DEL PERO MARTÍNEZ, M. A.; BASUALDO, N.; MENDOZA, R.; GARCÍA, I. Flavonoids of *Lotus tenuis* (Waldst. & Kit.) as markers of populations growing in soils of

different saline and hydrologic conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 21, n. 9, p. 1739-1745, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FOO, L. Y.; NEWMAN, R.; WAGHORN, G.; McNABB, W. C.; ULYATT, M. J. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*, Washington, v. 41, p. 617-624, 1996.

FRUTOS, P; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Madrid, v. 2, n. 2, p.191-202, 2004.

GARCÍA, D.E. Los metabolitos secundários de las espécies vegetales. *Pastos y Forrajes*, Cuba, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2004.

GEBREHIWOT, L.; BEUSELINLCK, P. R.; ROBERTS, C. A. Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal*, Madison, v. 94, n. 5, p. 1059-1065, 2002.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, C. M. R.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, R. G.; SALATINO, Q. Phytochemistry in perspective: Chemosystematics of the Papilionideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H (Eds.). *Advances in Legume Systematics*. Part 2. London: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 465-488.

GRANT, W. F. Interspecific hybridization and aphidploidy of *Lotus* as it relates to phylogeny and evolution. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 43-60.

GREENE, S. L. *Lotus* genetic resources: maintaining diversity through conservation. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 61-80.

GRUBER, M.; SKADHAUGE, B.; YU, M.; MUIR, A.; RICHARDS, K. Variation in morphology, plant habit, proanthocyanidins, and flavonoids within a *Lotus* germplasm collection. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 88, n. 1, p. 121, 2008.

HAGERMAN, A. E. *The Tannin Handbook*. Miami: Miami University Oxford. 2002. Disponível em: <http://www.users.muohio.edu/hagermae>.

HARAMANESCU, M. Effects of fertilization on polyphenols content in spring of forages from permanent grassland by PC & CA. *Lucrări științifice*, Iasi, v. 54, n. 2, p. 243-246, 2011.

HARING, D. A.; SUTER, D.; AMRHEIN, N.; LUSHERM A. Biomass allocation is an important determinant of the tannin concentration in growing plants. *Annals of Botany*, London, v. 99, n.1, p. 111-120, 2007.

HARRIS, W.; RHODES, I.; NEE, S. S. Observations on environmental and genotypic influences on the over wintering of white clover. *Journal of Applied Ecology*, London, v. 20, n. 2, p. 609-624, 1983.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action, *Journal of Natural Products*, Washington, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HEDQVIST, H.; MUELLER, I. H.; REED, J. D.; KRUEGER, C. G; MURPHY, M. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 87, n. 1-2, p. 41-56, 2000.

HERNANDEZ, S.; REBUFFO, M.; ARRIVILLAGA, S.; JAURENA, M.; LABANDERA, C.; RISSO, D.; CILIUTI, J. Evaluación de La interacción genótipo-ambiente em el establecimiento de *Lotus uliginosus* (Schkuhr) mediante cilindros de suelo, *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 35, n.1, p. 120-130, 2005.

HUGHES, H. D. Cuernecillo. In: HUGHES, H. D.; HEATH, M.; METCALFE, D. S. (Eds.). *Forages*. Ciudad de Mexico: Compañía Editora Continental, 1981. p. 215-232.

ICH - International Conference on Harmonization. *Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, 2005.

IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. *Las Leguminosas em Uruguay y regiones vecinas*. Montevideo: Editorial Agropecuária Hemisfério Sul, 1998. 549p.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C.; CHIM, J. F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv.'Tupy'. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

JANKE, A.; DALL'AGNOL, M.; SANTOS, A. M.; BISSANI, C. A. Seleção de populações de *Lotus corniculatus* L. com maior tolerância ao alumínio em solução nutritiva, *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, n. 11, p. 2366-2370, 2010.

JOHN, A.; LANCASHIRE, J. A. Aspects of the feeding and nutritive value of *Lotus* species. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, New Plymouth, v. 42, p. 152-159, 1981.

KELMAN, W. M. Germplasm sources for improvement of forage quality in *Lotus corniculatus* L. and *L. uliginosus* Schkuhr (Fabaceae). *Genetic Resources and Crop Evaluation*, Dordrecht, v. 53, n. 8, p. 1707-1713, 2006.

KELMAN, W. M.; TANNER, G. J. Foliar condensed tannin levels in *Lotus* species growing on limed and unlimed soils in south-eastern Australia. *Proceedings New Zealand Grassland Association*, New Plymouth, v. 52, p. 51-54, 1990.

KIDD, P.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELÓ, J. The role of root exudates in aluminum resistance and silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, London, v. 52, n. 359, p. 1339-1352, 2001.

KIRKBRIDE, J. H. Jr. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 1-20.

KOCHIAN, L. V. PIÑEROS, M.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 274, n. 1-2, p. 175-195, 2005.

KOELZER, J.; PEREIRA, D. A.; DALMARCO, J. B. PIZOLATTI, M.; PEREIRA, D.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*, Reading, v. 117, n. 3, p. 444-450, 2009.

KRAUS, T. E. C.; ZASOSKI, R. J.; DAHLGREN, R. A. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil*, v. 262, n. 1-2, p. 95-109, 2004.

KROLOW, R. H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W.; SIEWERDT, L.; ZONTA, E. P. Composição bromatológica de três leguminosas anuais de estação fria adubadas com fósforo e potássio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2231-2239, 2004.

KUINCHTNER, A.; BURIAL, G. A. Clima do estado do Rio Grande do Sul segundo a classificação de Köppen e Thornthwaite. *Disciplinarum Scientia*, Santa Maria, v. 2, n. 1, p. 171-182, 2001.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonoides. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 3, n. 14, 2000.

LOWTHER, W. L.; MANLEY, T. R.; BARRY, T. N. Condensed tannin concentrations in *Lotus corniculatus* and *L. pedunculatus* cultivars grown under low soil fertility conditions. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 30, n. 1, p. 23-25, 1987.

MA, Q. F.; RENGEL, Z.; KUO, J. Aluminum toxicity in rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic Ca²⁺ in intact root tips. *Annals of Botany*, Oxford, v. 89, n. 2, p. 241-244, 2002.

MacADAM, J. W.; GRIGGS, J. W.; BEUSELINCK, P. R.; GRABBER, J. H. Birdsfoot trefoil, a valuable tannin-containing legume for mixed pasture. *Forage and Grazinglands*, Saint Paul, 11p. Disponível em: <http://naldc.nal.usda.gov/download/11931/PDF>. 2006.

MACEDO, C. E.; JAN, V. S. Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 12, n. 4, p. 363–369, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biotecnologia da Reprodução*, Juiz de Fora, v. 27, p. 33-39, 2008.

MAKKAR, H. P. S. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 37, n. 4, p. 1197-1202, 1989.

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, Bloemfontein, v. 49, n. 3, p. 241-256, 2003a.

MAKKAR, H. P. S. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*. Springer: New York, 2003b. 26p.

MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B. Composition, tannin levels and in-sacco dry matter digestibility of fresh and fallen oak (*Quercus incana*) leaves. *Bioresource technology*, Trivandrum, v. 37, n. 2, p. 185-187, 1991.

MAROSO, R. P.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Desenvolvimento morfológico de *Lotus* spp. de diferentes hábitos de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1961-1968, 2007.

MAROSO, R. P.; CARNEIRO, C. M.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FAVERO, D. Morphological and anatomical aspects of birdsfoot trefoil and big trefoil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 38, n. 9, p. 1663-1667, 2009.

MEAGHER, L. P.; LANE, G.; SIVAKUMARAN, S.; TAVENDALE, M. H.; FRASER, K. Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 151-163, 2004.

- METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell and Environment*, Malden, v. 32, n. 6, p. 641–653, 2009.
- MILLER, P. R.; EHLKE, N. J. Condensed tannin relationships with in vitro forage quality analyses for birdsfoot trefoil. *Crop science*, Madison, v. 34, n. 4, p. 1074-1079, 1994.
- MOOJEN, E. L.; MARASCHIN, G. E. Potencial produtivo de uma pastagem nativa do Rio grande do Sul submetida a níveis de oferta de forragem. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n.1, p. 127-132, 2002.
- MONTEIRO, I. D.; PAIM, N. R. Teste de progênies de policruzamento de *Lotus uliginosus*. I. Em mistura com azevém anual. II. Em linhas individuais e com a cultivar Maku. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 10, p. 1483-1489, 1982.
- MONTEIRO, J. M. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MORO, G. V.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; ABDALLA, A. L.; REGINATTO, F. H.; PEÇANHA, M. R.; COSTA, G. M. Aspectos químicos do gênero *Lotus* L. com ênfase em metabólitos secundários. *ARS Veterinaria*, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 113-119, 2010.
- MORRIS, P.; CARRON, T. R.; ROBBINS, M. P.; WEBB, K. J. Distribution of condensed tannins in flowering plants of *Lotus corniculatus* var. *japonicus* and tannin accumulation by transformed root cultures. *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 24, p. 60-63, 1993.
- NAVASCUÉS, J.; PEREZ-RONTOMÉ, C.; SANCHEZ, D. H.; STAUDINGER, C.; WIENKOOP, S.; RÉLLAN-ÁLVAREZ, R.; BECANA, M. Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. *New Phytologist*, Lancaster, v. 193, n. 3, p. 625–636, 2012.
- NOZELLA, E. F. *Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes*. 2001. 72p. Dissertação (Mestrado/Zootecnia) Centro de Energia Nuclear na Agricultura Piracicaba, USP, Piracicaba, 2001.

PAIM, N. R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 19, p. 37-43, 1988.

PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 10, p. 1699-1704, 1991.

PAL'OVE-BALANG, P.; ČIAMPOROVÁ, M.; ZELINOVÁ, V.; PAVLOVKIN, J.; GURINOVÁ, E.; MISTRÍK, I. Cellular responses of two Latin-American cultivars of *Lotus corniculatus* to low pH and Al stress. *Central European Journal of Biology*, Louisville, v. 7, n. 6, p. 1046-1054, 2012.

PAVLOVKIN, J.; PAL'OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L.; ZELINOVÁ, V. Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. *Journal of Plant Physiology*, Irvine, v. 166, n. 14, p.1479-1487, 2009

PERES, L. E. P. *Metabolismo secundário*. São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004. 25p.

PIÑEDO, L. A. Taninos condensados em espécies forrajeras y sus efectos em la productividad animal. *Revista Nutritime*, Viçosa, v. 5, n. 3, p. 584-591, 2008.

PIÑEROS, M.; SHAFF, J. E.; MANSLANK, H. S.; CARVALHO-ALVES, V. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation: A comparative physiological study. *Plant Physiology*, Maryland, v. 137, n.1, p. 231–241, 2005.

PRESTES, N. E.; JACQUES, A. V. A. Sobressemeadura do cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel em pastagem natural: diferimento e adubação. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 2, n. 2, p. 73-81, 2002.

QUEIROZ, C. R. A. D. A.; MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D. Characterization of aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*) wood tannins. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 493-497, 2002.

RAIJ, B.V. *Fertilidade do solo e manejo de nutrientes*. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420p.

RAMIREZ-RESTREPO, C. A.; BARRY, T. N.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; KEMP, P. D.; McNABB, W. C. *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase lamb and wool production under commercial dryland farming conditions without the use of anthelmintics. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 85-105, 2004.

RAMIREZ-RESTREPO, C. A.; BARRY, T. N.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. Organic matter digestibility of condensed tannin-containing *Lotus corniculatus* and its prediction *in vitro* using cellulose/hemicelluloses enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 61-71, 2006.

REYNAUD, D.; LUSSIGNOL, M. The flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 35, n.1, p. 75-82, 2005.

ROBERTS, C. A.; BEUSELINCK, P. R.; ELLERSIECK, M. R.; DAVIS, D. K.; MCGRAW, R. L. Quantification of tannins in birdsfoot trefoil germplasm. *Crop Science*, Madison, v. 33, n. 4, p.675-679, 1993.

SANTOS, A.; DALL'AGNOL, M.; RAMOS, G. Aumento da exudação radicular de ácido oxálico em *Lotus corniculatus* em resposta a presença de alumínio em solução nutritiva. In: *Reunião Del grupo técnico em forrajeiras del cono sur*, 22., 2008. Minas, Uruguai. Memórias... Montevideo: Tradinco, [2008]. (CD-ROM).

SANTOS, D. R dos.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; ROBAINA, A. D.; ANGHINONI, I.; FLORES, J. P. C.; HORN, D. Situação da fertilidade dos solos no estado do Rio Grande do Sul. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2001. 32p. (Boletim Técnico, 1)

SANTOS, R. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. (Coord.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p. 333-64.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. (Coord.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p. 615-683.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e valor nutritivo de forragem de leguminosas nativas (*Adesmia* DC.) e exóticas (*Lotus* L.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 975-982, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRUSCOLO, M. C.; BARÉA, K.; BENINCÁ, R. C.; LUBENOW, R.; CECCHETTI, D. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2197-220, 2002.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; VENDRUSCOLO, M. C.; CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*) em função do estágio fenológico no primeiro corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1871-1880, 2005.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMI, R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, Weinheim, v. 53, n. 2 p. 310-329, 2009.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Revista Nutritime*, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 21-32, 1999.

SINGH, D.; DIKSHIT, H. K.; SINGH, R. Variation of aluminium tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Plant Breeding*, Berlim, v. 131, n. 6, p. 751-761, 2012.

SIVAKUMARAN, S.; RUMBALL, W.; LANE, G. A.; FRASER, K.; FOO, L. Y.; YU, M.; MEAGHER, L. P. Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. *Journal of Chemical Ecology*, Florida, v. 32, n. 8, p. 1797-1816, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIENAM, T. A. *Princípios de análise instrumental*. Porto Alegre: Bookman, 2002, 194p.

SOUZA, D. M. G.; MIRANDA, L. N.; OLIVEIRA, S. A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L., (Eds.) *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.205-274.

STEELE, H. L.; WERNER, D.; COOPER, J. E. Flavonoids in seed and root exudates of *Lotus pedunculatus* and their biotransformation by *Mesorhizobium loti*. *Physiologia Plantarum*, Lund, v. 107, n. 3, p. 251–258, 1999.

STEINER, J. J. Birdsfoot trefoil origins and germplasm diversity. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed.). *Trefoil: the science and technology of Lotus*. Madison: Crop Science Society of America, 1999. p. 81-96.

STEINER, J. J.; SANTOS, G. G. Adaptive ecology of *Lotus* genotypes. *Crop Science*, Madison, v. 41, n. 2, p. 552-563, 2001.

STRITTMATTER, C. D.; RIVERO, M.; WAGNER, M.; KADE, M.; RICCO, R. A.; GURNI, A. A. *In vivo* and *in vitro* flavonoid production in *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. *Lotus Newsletter*, Montevideo, v. 22, p. 1417, 1991.

SUZUKI, H. SASAKI, R. OGATA, Y.; NAKAMURA, Y.; SAKURAI, N.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; KANAYA, S.; AOKI, K.; SHIBATA, D.; SAITO, K. Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Phytochemistry*, Washington, v. 69, n. 1, p. 99-111, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

TANNER, G. J.; MOORE, A. E.; LARKIN, P. J. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora in vitro. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v. 71, n. 6, p. 947-958, 1994.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. E VOLKWEISS, S. J. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. 2ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

VARDAR, F.; ÜNAL, M. Aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Advances in Molecular Biology*, Istanbul, v. 1, n.1, p. 1-12, 2007.

VÁSQUEZ, M. D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial

growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology*, Rockville, v. 119, n. 2, p. 435-444, 1999.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

ZATARIM, M.; CARDOSO, A. I. I.; FURTADO, E. L. Efeito de tipos de leite sobre oídio em abóbora plantadas a campo. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.198-201, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. (Coord.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p. 577-614.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production: progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 116-139, 2008.

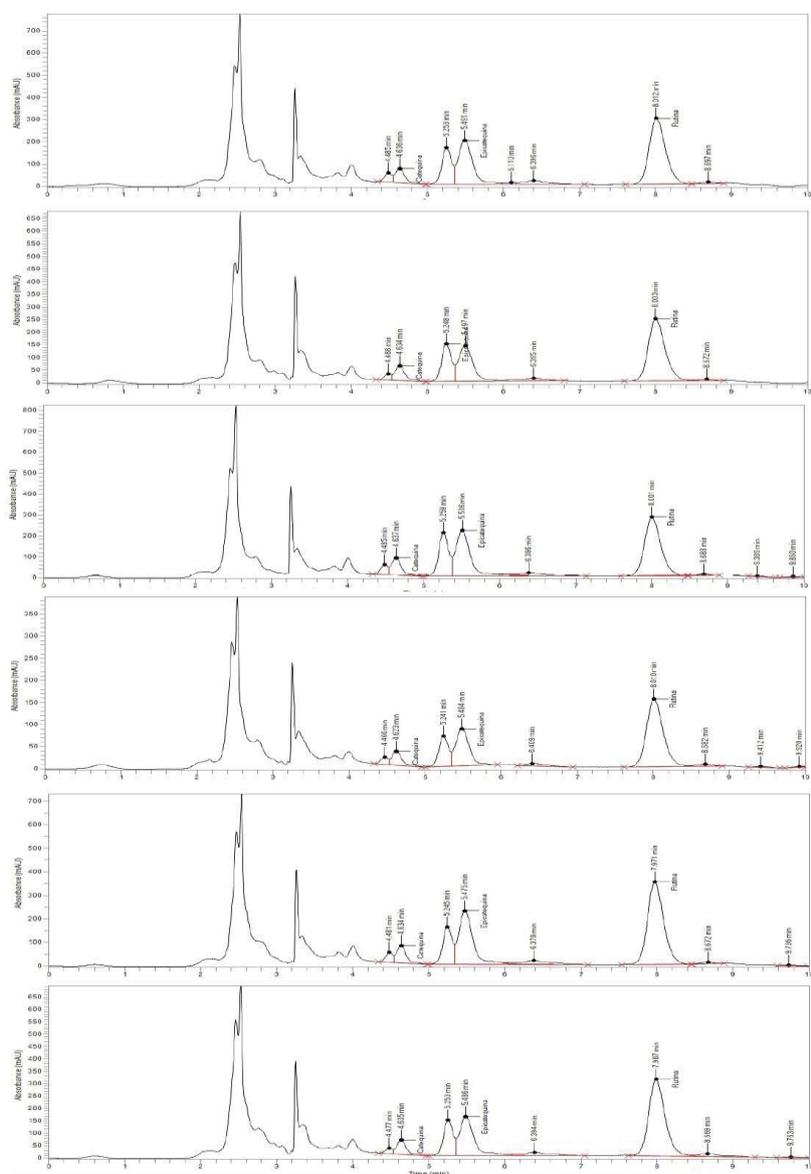
WAGHORN, G. C.; JONES, W. T. Bloat in cattle 46: potential of dock (*Rumex obtusifolius*) as an antibloat agent for cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 32, n. 2, p. 227-235, 1989.

WAGHORN, G. C.; JONES, W. T.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C. Condensed tannins and the nutritive value of herbage. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, Dunedin, v. 51, p. 171-176, 1990.

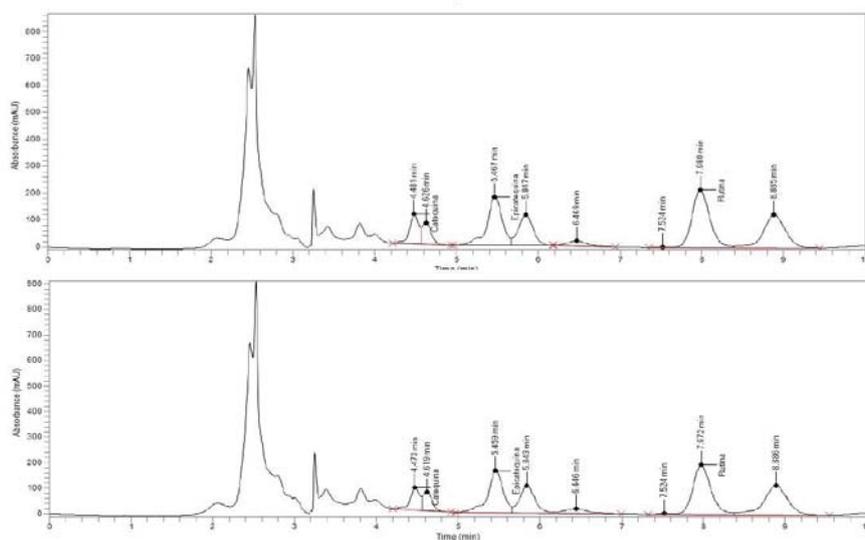
WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas*. 2 ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1996.

WEN, L.; ROBERTS, C. A.; WILLIAMS, J. E.; KALLENBACH, R. L.; BEUSELINCK, P. R.; MCGRAW, R. L. Condensed tannin concentration of rhizomatous and nonrhizomatous birdsfoot trefoil in grazed mixtures and monocultures. *Crop Science*, Madison, v. 43, n. 1, p. 302-306, 2003.

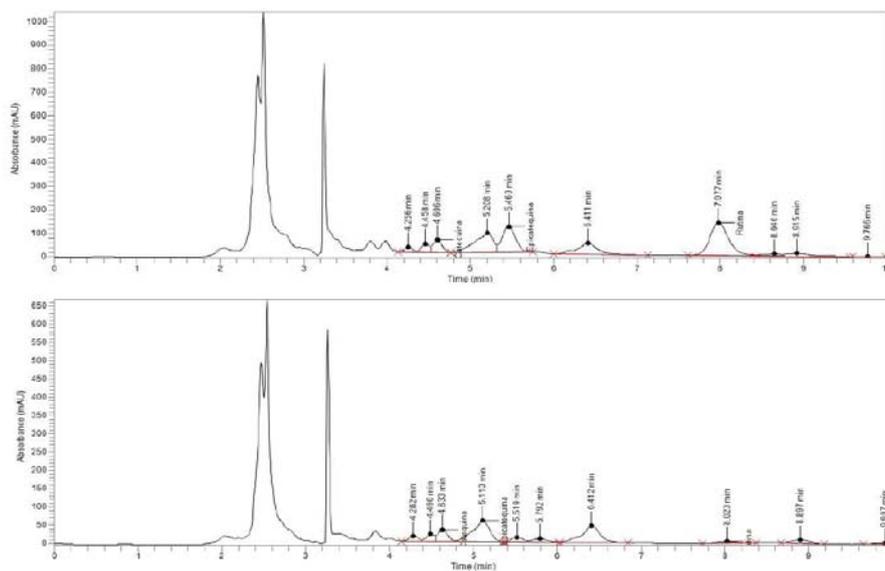
APÊNDICES



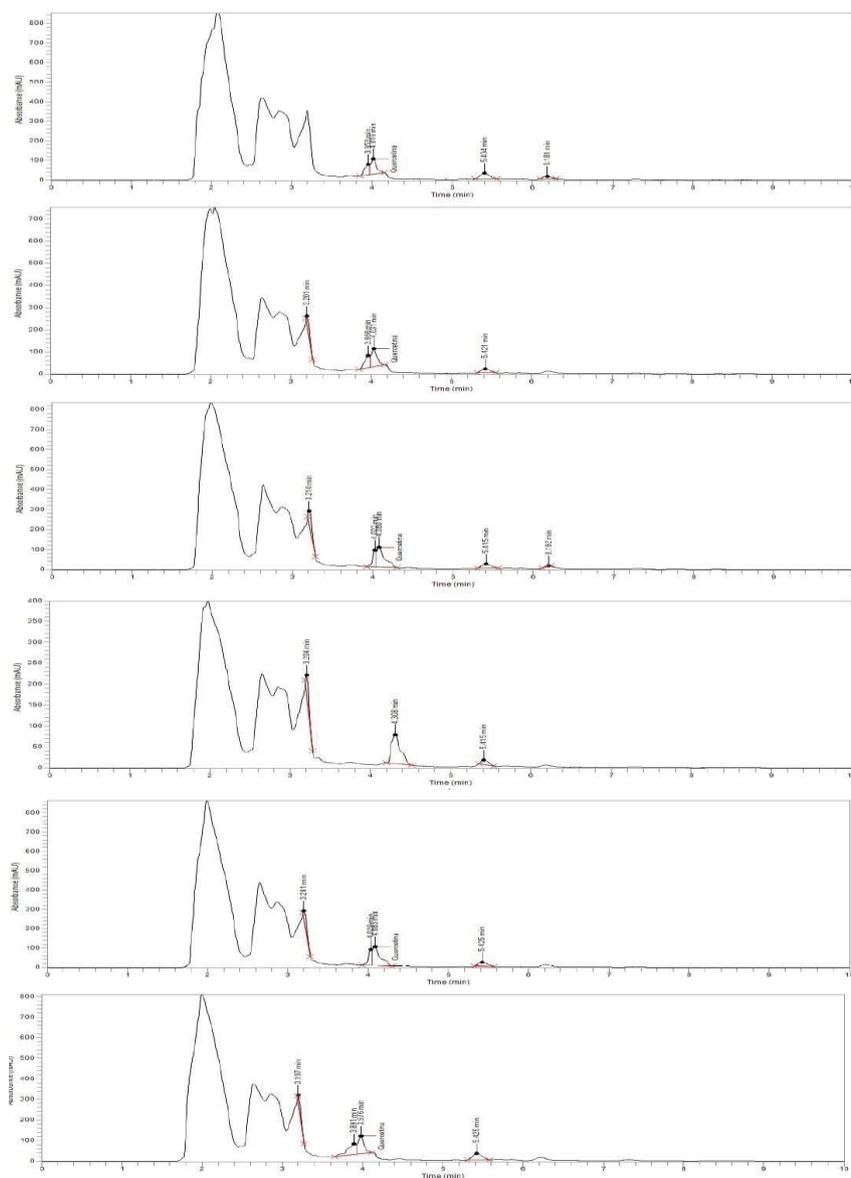
Apêndice 1-Cromatogramas para detecção simultânea de catequina, epicatequina e rutina de três genótipos de *L. corniculatus* em solo sem calagem e com calagem respectivamente (cv. São Gabriel sem calagem/ com calagem; pop.UFRGS sem calagem/ com calagem; cv. Ganador sem calagem/com calagem.)



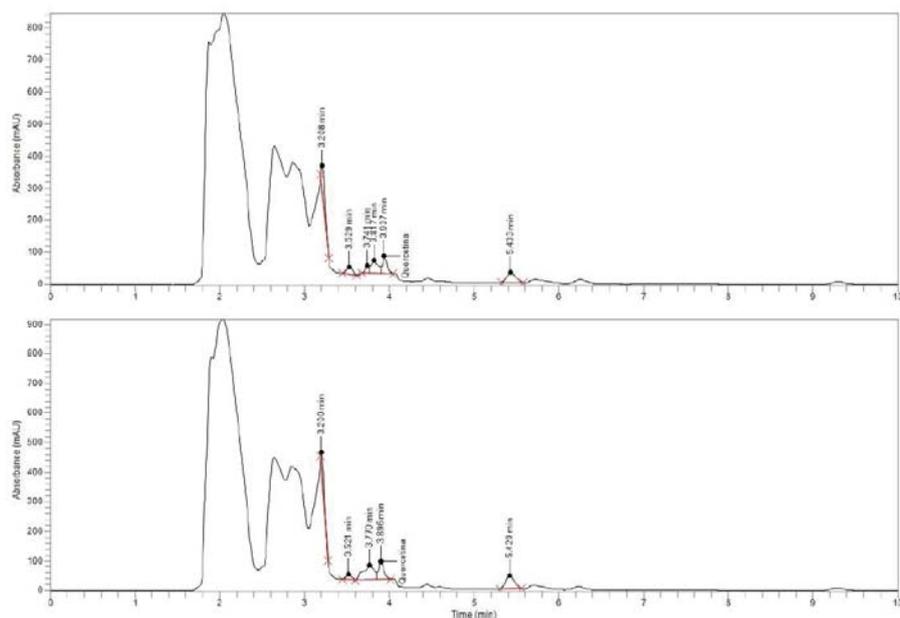
Apêndice 2-Cromatogramas para detecção simultânea de catequina, epicatequina e rutina de *L. uliginosus* em solo sem calagem e com calagem, respectivamente.



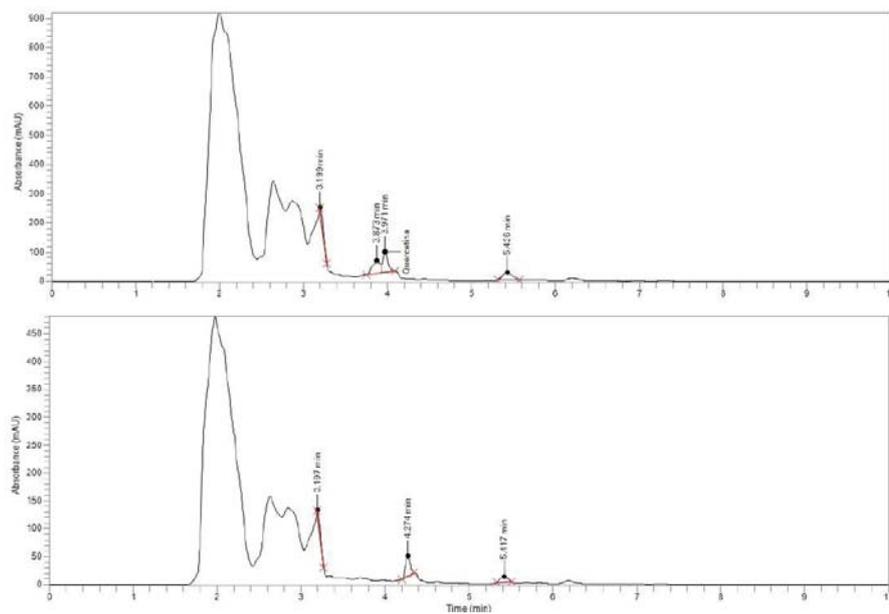
Apêndice 3-Cromatogramas para detecção simultânea de catequina, epicatequina e rutina de *L. subbiflorus* em solo sem calagem e com calagem, respectivamente.



Apêndice 4-Cromatogramas para detecção de quercetina de três genótipos de *L. corniculatus* em solo sem calagem e com calagem respectivamente (cv. São Gabriel sem calagem/ com calagem; pop. UFRGS sem calagem/ com calagem; cv. Ganador sem calagem/ com calagem.)



Apêndice 5-Cromatogramas para detecção de quercetina de *L. uliginosus* em solo sem calagem e com calagem respectivamente



Apêndice 6-Cromatogramas para detecção de quercetina de *L. subbiflorus* em solo sem calagem e com calagem, respectivamente.

