

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

**ASPECTOS ALELOPÁTICOS, FITOQUÍMICOS E
ANATÔMICOS DO CAPIM-ANNONI
(*Eragrostis plana* Nees)**

ADRIANA FAVARETTO

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 2014

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

**ASPECTOS ALELOPÁTICOS, FITOQUÍMICOS E
ANATÔMICOS DO CAPIM-ANNONI
(*Eragrostis plana* Nees)**

ADRIANA FAVARETTO

**Orientadora: Prof^a. Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coorientadora: Prof^a. Dra. Andréa Michel Sobottka**

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 2014

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

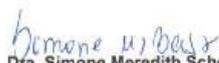
"Aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)"

Elaborada por

Adriana Favaretto

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

Aprovada em: 18/03/2014
Pela Comissão Examinadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Andréa Michel Sobottka
ICB-UPF
Coorientadora


Dra. Grace Gosmann
UFRGS


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


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Naylor Bastiani Perez
Empresa Pecuária Sul

CIP – Catalogação na Publicação

- F272a Favaretto, Adriana
Aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do
capim-annoni : (eragrostis plana nees) / Adriana
Favaretto. – 2014.
124 f. : il., color. ; 25 cm.
- Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2014.
Orientadora: Prof^ª. Dra. Simone Meredith Scheffer-
Basso.
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Michel Sobottka.
1. Capim. 2. Alelopatia. 3. Ecologia vegetal. I.
Scheffer-Basso, Simone Meredith, orientadora. II.
Sobottka, Andréa Michel, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.2

Catálogo: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/857

BIOGRAFIA DO AUTOR

Adriana Favaretto nasceu em 07 de fevereiro de 1990 na cidade de Tapejara, Rio Grande do Sul. Em 2011 concluiu o curso de Ciências Biológicas-Bacharel pela Universidade de Passo Fundo (UPF). No ano de 2012 ingressou no Mestrado em Agronomia do Programa de Pós Graduação em Agronomia – UPF. Para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, desenvolveu pesquisas inéditas referentes aos aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees), utilizando de técnicas cromatográficas, histoquímicas, anatômicas e bioensaios de laboratório.

“Se enxerguei mais longe foi por estar apoiado sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

*Dedico aos meus pais
Miguel e Zelinda*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir estar aqui, viver essa experiência e iluminar meus passos, mostrando sempre o melhor caminho.

Aos meus pais, Miguel e Zelinda, e ao meu irmão Everton, bem como a todos os meus familiares, por estarem sempre presentes, me ajudarem e apoiarem nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, professora Dra. Simone Meredith Scheffer Basso, pela excelência na orientação, pela presença constante, ajuda e conselhos. Obrigada por ter me aceitado como sua orientada e por ter compartilhado seu conhecimento comigo. És meu maior exemplo, por ser essa profissional comprometida, justa e dedicada.

À professora Dra. Andréa M. Sobottka, pela coorientação, por toda a ajuda e apoio.

À professora Me. Charise D. Bertol, pela imensa ajuda na execução do trabalho. Obrigada por sua presença constante, paciência, por disponibilizar seu tempo para me ensinar, por sempre me incentivar a continuar e acreditar que tudo daria certo.

À professora Dra. Cercí Maria Carneiro, por toda a ajuda com a anatomia, pela convivência e ensinamentos.

À Me. Fabiana Tonial, pelos ensinamentos na execução do trabalho, pela amizade e experiências compartilhadas.

Aos funcionários do curso de Farmácia da UPF, por terem me acolhido tão bem e por serem sempre prestativos.

Aos meus colegas de laboratório e amigos: Sílvia, Jossana, Kalinca, Francis e Augusto, pela amizade, apoio, cumplicidade e ajuda. Obrigada. Vocês são especiais e tornaram meus dias no laboratório mais felizes.

A todos os meus amigos, por estarem presentes em mais essa etapa da minha vida, obrigada pela amizade, incentivo e compreensão.

Aos professores do ppgAGRO, por contribuírem com a minha formação profissional.

Aos colegas do ppgAGRO, pelas experiências compartilhadas e pela amizade.

À UPF e ao ppgAGRO, pela oportunidade

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Pecuária Sul, na pessoa do pesquisador Naylor Bastiani Perez, líder do projeto: Rede de pesquisa em Capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees): ampliação do conhecimento e controle, por nos inserir nesta rede de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Invasões biológicas: a problemática do capim-annoni.....	7
2.2 Alelopatia e os aleloquímicos.....	9
2.3 Anatomia e histoquímica.....	15
2.3.1 Aspectos anatômicos de <i>Eragrostis</i> spp.....	15
2.3.2 A anatomia vegetal e sua relação com o sucesso das plantas invasoras.....	16
2.3.3 Histoquímica.....	19
CAPÍTULO I	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Bioensaio de germinação.....	31
3.2 Bioensaio de crescimento inicial.....	34
4 CONCLUSÕES	42
CAPÍTULO II	43
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Coleta do material vegetal.....	48
2.2 Testes gerais de identificação.....	48
2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	50
2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
2.4.1 Extração.....	52
2.4.2 Reagentes.....	53
2.4.3 Preparo das amostras e soluções-SQR.....	53
2.4.4 Equipamentos e condições cromatográficas.....	54
2.4.5 Validação do método.....	54
2.4.6 Seletividade.....	55

2.4.7 Linearidade, limite de detecção e de quantificação..	55
2.4.8 Exatidão.....	56
2.4.9 Precisão.....	56
2.4.10 Robustez.....	57
2.4.11 Análise estatística.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.1 Resultados.....	58
3.1.1 Análise fitoquímica por testes gerais de identificação e CCD.....	58
3.1.2 Validação do método cromatográfico.....	62
3.1.2.1 Seletividade.....	64
3.1.2.2 Linearidade, limite de detecção e quantificação....	65
3.1.2.3 Exatidão e precisão.....	67
3.1.2.4 Robustez.....	68
3.1.3 Análise fitoquímica por CLAE.....	69
3.2 Discussão.....	72
4 CONCLUSÕES.....	77
CAPÍTULO III.....	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
1 INTRODUÇÃO.....	80
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 Análise anatômica.....	84
3.2 Análise histoquímica.....	89
4 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – Autotoxicidade em capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Tabela		Página
1	Caracterização dos extratos aquosos de capim-annoni quanto ao pH.....	28

CAPÍTULO II – Perfil fitoquímico do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Tabela		Página
1	Testes gerais de identificação de grupos químicos em folhas e raízes de capim-annoni.....	50
2	Condições cromatográficas empregadas na análise de grupos químicos por meio de CCD.....	52
3	Resultado dos testes gerais de identificação em folhas e raízes de capim-annoni.....	58
4	Equações lineares e coeficientes de correlação das SQRs.....	66
5	Limites de detecção e quantificação dos métodos para cada SQR.....	67
6	Exatidão (expressa em % de recuperação) das SQRs.....	68
7	Precisão intra-dia das SQRs.....	68
8	Condições cromatográficas e faixas investigadas durante o teste de robustez para as SQRs.....	69
9	Concentração dos compostos encontrados em folhas e raízes de capim-annoni.....	72

CAPÍTULO III – Caracteres anatômicos e histoquímicos de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Tabela		Página
1	Histoquímica de folhas e raízes de capim-annoni.....	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - Autotoxicidade em capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Figura		Página
1	Germinabilidade de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	32
2	Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	33
3	Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	33
4	Percentual de mortalidade de plântulas de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	34
5	Percentual de plântulas vivas normais de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	35

Figura		Página
6	Percentual de plântulas vivas anormais de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	35
7	Anormalidades encontradas em plântulas de capim-annoni submetidas aos extratos aquosos de folhas verdes, folhas senescentes e raízes. A: controle; B: plântula com clorose na parte aérea (FV 0,25 g.mL ⁻¹); C: plântula com necrose na parte aérea (FV 0,15 g.mL ⁻¹); D: raízes escuras e ausência de raízes secundárias (R 0,25 g.mL ⁻¹); E: raiz retorcida (FV 0,15 g.mL ⁻¹).....	37
8	Percentual de inibição e/ou estímulo do crescimento da raiz e parte aérea das plântulas de capim-annoni crescidas sob influência de distintas concentrações de extratos aquosos de folhas e raízes da mesma espécie.....	39

CAPÍTULO II – Perfil fitoquímico do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Figura		Página
1	Organograma representando a partição com solventes de polaridade crescente em extratos brutos hidrometanólicos de folhas e raízes de capim-annoni.....	51
2	Placa cromatográfica dos extratos brutos e semi-purificados de folhas e raízes de capim-annoni. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FB: fração butanólica do extrato de folha; RB: fração butanólica do extrato de raiz; RUT: rutina (SQR); QUERC: quercetina (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10). Observação sob luz UV 254 nm.....	59

Figura		Página
3	Placa cromatográfica dos extratos brutos e semi-purificados de folhas e raízes de capim-annoni. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FAE: fração acetato de etila do extrato de folha; RAE: fração acetato de etila do extrato de raiz; FB: fração butanólica do extrato de folha; RB: fração butanólica do extrato de raiz; CAT: catequina (SQR); ÁC GAL: ácido gálico (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10). Observação sob luz UV 365 nm.....	60
4	Placa cromatográfica para detecção de alcaloides. RBr: extrato bruto de raiz; FBr: extrato bruto de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RAE: fração acetato de etila do extrato de raiz; FAE: fração acetato de etila do extrato de folha; PIL: pilocarpina (SQR); QUI: quinina (SQR); CAF: cafeína (SQR). Fase móvel: tolueno:acetato de etila (95:5). Revelador: Reagente de Dragendorff.....	61
5	Placa cromatográfica para detecção de saponinas. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; URS: ácido ursólico (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (30:30:10). Revelador: vanilina sulfúrica.....	62
6	Cromatograma obtido com as SQRs ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	63
7	Cromatograma obtido com a SQR cumarina na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	64
8	Pureza dos picos das SQRs ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, verificada pelo detector de arranjo de diodos (PDA) e calculada pelo software Chromera Flexar.....	65

Figura	Página
9	Pureza do pico da SQR cumarina, verificada pelo detector de arranjo de diodos (PDA) e calculada pelo software Chromera Flexar..... 65
10	Perfil cromatográfico de folhas (A) e raízes (B) de capim-annoni para detecção de ácidos fenólicos..... 70
11	Perfil cromatográfico de folhas (A) e raízes (B) de capim-annoni para detecção de cumarina..... 71
12	Perfil cromatográfico de folhas de capim-annoni para detecção de catequina e epicatequina..... 71

CAPÍTULO III – Caracteres anatômicos e histoquímicos de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

Figura	Página
1	Secção transversal da folha de capim-annoni. A: folha inteira. B: feixe vascular evidenciando estrutura Kranz. C: quilha. Cb = células buliformes; Eb = epiderme abaxial; Ed = epiderme adaxial; Ee = extensão esclerenquimática; Ep = extensão parenquimática; F = floema; Fg = feixes vasculares de tamanho grande; Fp = feixes vasculares de tamanho pequeno; Kr = estrutura Kranz; Tt = tricomas tectores; X = xilema..... 85
2	Secção transversal da raiz de capim-annoni. A: raiz inteira. B: detalhe do aerênquima; En = endoderme; Ep = epiderme; Ex = exoderme; F = floema; Mp = medula parenquimática; X = xilema..... 89
3	Testes histoquímicos em folhas de capim-annoni. A: detecção de lipídios. B: detecção de alcaloides. C: detecção de fenóis. D: detecção de lignina..... 91
4	Testes histoquímicos em raízes de capim-annoni. A: detecção de lipídios. B: detecção de lignina. C: detecção de amido. D: detecção de alcaloides..... 92

ASPECTOS ALELOPÁTICOS, FITOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DO CAPIM-ANNONI

ADRIANA FAVARETTO¹

RESUMO – O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil, cuja expansão é, parcialmente, atribuída ao seu potencial alelopático. Este trabalho, inédito para a planta, teve como objetivo verificar o potencial autotóxico, a composição química e as características anatômico/histoquímicas dessa gramínea, por meio de três experimentos: 1) A autotoxicidade de extratos aquosos de folhas e raízes na germinação e crescimento inicial de plântulas da espécie foi realizada com extratos de folhas verdes, folhas senescentes e raízes, nas concentrações de 0,05, 0,15 e 0,25 g.mL⁻¹. Observou-se a ocorrência da autotoxicidade, independentemente do material de origem e da concentração; 2) A identificação dos principais grupos químicos, potencialmente alelopáticos, presentes em folhas e raízes, foi realizada por meio de testes gerais de identificação, por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devidamente validada. Testes gerais evidenciaram a presença de saponinas, alcaloides e flavonoides em folhas e raízes, e taninos somente em folhas. Por CCD, foram detectados alcaloides e saponinas; por CLAE, verificou-se a presença de cumarina, em mesma quantidade em folhas e raízes, ácido ferúlico,

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia (ppgAGRO) da FAMV/UPF, área de concentração em Produção Vegetal.

em maior quantidade em raízes, ácido cafeico, p-cumárico e vanílico, em maiores quantidades nas folhas, e catequina e epicatequina, somente nas folhas; 3) Para análise anatômica e histoquímica, foram coletadas folhas e raízes das plantas em estágio vegetativo. Para a anatomia, segmentos desses órgãos foram fixados em FAA 70, seccionados, corados e fotografados em microscópio óptico. Para avaliação histoquímica, foram realizados cortes em folhas e raízes recém-coletadas. Os segmentos foram submetidos a reagentes específicos para verificar a presença de lipídios, fenóis, taninos, lignina, alcaloides e amido. Observou-se que as folhas apresentam epiderme com células lignificadas, estrutura Kranz, feixes vasculares colaterais de dois tamanhos e tricomas tectores; a raiz possui lacunas de ar no parênquima cortical, formando aerênquima; a endoderme possui espessamento em forma de “U” e a medula parenquimática tem células com plastídios armazenadores de amido. Folhas e raízes apresentam lipídios, compostos fenólicos, lignina e alcaloides, mas o amido foi observado somente na raiz. Os caracteres anatômicos e histoquímicos do capim-annoni podem ter associação com sua elevada adaptação a solos compactados, bem como sua tolerância a herbivoria, estresses bióticos e abióticos.

Palavras-chave: alelopatia, anatomia, fitoquímica, histoquímica, invasora.

ALLELOPATHIC, PHYTOCHEMICAL AND HISTOCHEMICAL ASPECTS OF TOUGH LOVEGRASS

ABSTRACT - The tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees) is the main invasive of natural pastures of southern Brazil, whose expansion is partly attributed to its allelopathic potential. This study, unpublished for the plant, aimed to verify the autotoxicity, chemical composition and anatomical/histochemical characteristics of this grass, through three experiments: 1) The autotoxicity of aqueous extracts of leaves and roots at germination and seedling growth of the species was performed with extracts from green leaves, senescent leaves and roots at concentrations of 0.05, 0.15 and 0.25 g.mL⁻¹. It was observed that the occurrence of autotoxicity, regardless of the source material and concentration; 2) The identification of the main chemical groups, potentially allelopathics, presents in leaves and roots, was performed by means of general tests, by thin layer chromatography (TLC) and by high performance liquid chromatography (HPLC), duly validated. General tests showed the presence of saponins, alkaloids and flavonoids in leaves and roots, and tannins in leaves only. By TLC, alkaloids and saponins were detected; by HPLC, was verified the presence of coumarin in the same amount in leaves and roots, ferulic acid, in greater amounts in the roots, caffeic acid, p-coumaric acid and vanillic acid in larger quantities in leaves, and catechin and epicatechin, only the leaves; 3) To anatomical and histochemical analysis, leaves and roots of plants in vegetative stage were collected. For anatomy, leaf blades and roots were collected, fixed in FAA 70, sectioned, stained and photographed in light microscope. For

histochemical analysis, sections on newly collected leaves and roots were performed. The segments were subjected to specific reagents to determine lipids, phenols, tannins, lignin, alkaloids and starch. It was observed that the leaves have epidermis with lignified cells, Kranz structure, collateral vascular bundles of two sizes and needle-shaped trichomes. The roots have air gaps on the cortical parenchyma, forming the aerenchyma; the endoderm has “U” shaped thickening and pith parenchymatic has cells with starch storage plastids. Leaves and roots have lipids, phenolic compounds, lignin and alkaloids, but the starch was observed only at the root. The anatomical and histochemical characters of tough lovegrass may be associated with their high adaptation to compacted soils, as well as its tolerance to herbivory, abiotic and biotic stresses.

Key-words: allelopathy, anatomy, histochemical, invasive, phytochemical.

1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é considerado a invasora mais agressiva dos campos do sul do Brasil, causando além de prejuízos econômicos à pecuária do estado, danos e perdas irrecuperáveis à biodiversidade dos campos naturais. Entre os fatores associados à agressividade dessa espécie, estão o seu potencial alelopático e caracteres anatômicos que propiciam o baixo consumo por herbívoros e que, por outro lado, conferem elevada tolerância a estresses bióticos e abióticos.

O efeito alelopático é classificado em dois tipos: (1) heterotoxicidade, quando a substância de determinada espécie é fitotóxica para outra espécie; (2) autotoxicidade: quando a substância é fitotóxica para a própria espécie. A heterotoxicidade do capim-annoni já foi constatada sobre gramíneas e leguminosas forrageiras (COELHO, 1986; FAVARETTO et al., 2011; FERREIRA et al., 2008). Extratos aquosos de folhas do capim-annoni tem maior potencial heterotóxico em relação àqueles elaborados com raízes, possivelmente devido a diferenças na composição química e/ou na concentração dos aleloquímicos presentes nesses órgãos (FAVARETTO et al., 2011).

Embora os aleloquímicos possam pertencer a qualquer uma das classes de compostos do metabolismo secundário, eles geralmente pertencem aos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (TREZZI, 2002). Para determinar a presença e concentração desses aleloquímicos nas plantas, as técnicas de cromatografia mostram-se eficazes e a fitoquímica torna-se uma importante aliada nos estudos de

alelopatia. Plantas possuidoras de compostos com atividade alelopática inibitória podem ser utilizadas como herbicidas naturais eficientes, e também, servir como indicativos para possíveis fontes de novos compostos com ação biocida (SILVA, 2012).

A localização dos grupos químicos nas plantas pode ser verificada por meio da histoquímica, uma técnica em que cortes anatômicos são submetidos a reagentes específicos que, ao conferirem cor às estruturas celulares, permitem elucidar a sua natureza e estrutura química. Da mesma forma que a fitoquímica, as características anatômicas do capim-annoni também não foram estudadas. No entanto, essas características podem ser importantes para, juntamente com a atividade alelopática, explicar as relações ecológicas, mecanismos de invasão e adaptação desta espécie a condições bióticas adversas.

Este trabalho foi conduzido com os seguintes objetivos:

- Verificar a autotoxicidade de extratos aquosos de folhas e raízes de capim-annoni na germinação e crescimento inicial de plântulas;
- Identificar, por meio de diferentes testes fitoquímicos, os principais aleloquímicos em folhas e raízes do capim-annoni, bem como validar metodologia analítica para detecção e quantificação de compostos fenólicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, vanílico e a cumarina, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Analisar anatômica e histoquimicamente folhas e raízes do capim-annoni, a fim de subsidiar estudos ecofisiológicos e químicos dessa importante invasora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Invasões biológicas: a problemática do capim-annoni

Plantas invasoras são espécies com origem em outro ambiente e que, no ambiente invadido, produzem descendentes em número muito elevado e conseguem se dispersar a grandes distâncias da planta mãe, perturbando a estrutura do ecossistema invadido. Atualmente, a invasão biológica é reconhecida como a principal ameaça à biodiversidade do planeta (SCHNEIDER, 2007).

No Brasil, várias espécies de gramíneas de origem africana foram introduzidas acidentalmente ou para fins forrageiros, tornando-se invasoras nos ambientes abertos, como campos e cerrados. Além de afetarem diretamente as populações nativas por competição, as gramíneas africanas impactam o ecossistema, modificando sua estrutura (FREITAS & PIVELLO, 2006). Entre estas gramíneas, destaca-se o capim-annoni, considerado atualmente a invasora mais agressiva dos campos do sul do Brasil (MEDEIROS et al., 2004).

O capim-annoni foi introduzido no Rio Grande do Sul como impureza em lotes de sementes de capim-de-rhodes (*Chloris gayana* Kunth) e capim-chorão (*Eragrostis curvula* (Schrader) Nees), importadas da África do Sul no final da década de 50 (REIS, 1993). Apesar de ter chegado como impureza, o Grupo Rural Annoni, de Sarandi-RS, passou a produzir e comercializar suas sementes, divulgando a espécie como uma forrageira excelente e revolucionária, por seu porte vigoroso e boa produção de massa verde e sementes

(REIS & COELHO, 2000). Este fato motivou pecuaristas a semeá-la em seus campos, contribuindo com a difusão da espécie (MEDEIROS & FOCHT, 2007).

O capim-annoni é uma espécie perene, estival e cespitosa, formando touceiras profundamente enraizadas, que podem atingir mais de um metro de altura quando florescidas. Sua rota fotossintética é C₄. A parte aérea e o sistema radicial são muito resistentes à tração mecânica. Os colmos são eretos, subcomprimidos, bastante achatados na parte basal (característica que permite sua identificação), com nós pouco salientes, glabros e de coloração verde-acinzentada. As raízes fibrosas são abundantes e muito compridas e, em condições favoráveis, podem se aprofundar no solo de dois a três metros. As folhas são formadas a partir do colo da planta. As bainhas, dobradas e achatadas, encaixam-se sucessivamente na parte basal, formando um conjunto plano, liso e brilhante. As folhas têm coloração verde clara, são lisas e glabras. As inflorescências de panículas eretas, com 10 a 40 cm de comprimento, possuem formato lanceolado. A espiguetta é multiflora, geralmente com 8 a 9 antécios hermafroditos. A cariopse é estreito-ovalada, comprimida lateralmente e de cor castanha (KISSMANN, 1991).

A espécie se estabelece em campos degradados por pastejo, pisoteio excessivo ou cultivo intenso do solo e em margens de estradas (MEDEIROS & FOCHT, 2007). Uma vez estabelecida, responde pela drástica redução na frequência e riqueza de muitas espécies nativas (MEDEIROS et al., 2004) e pela queda da produtividade pecuária (REIS, 1993), com prováveis prejuízos também à riqueza biológica do solo (MEDEIROS & FOCHT, 2007).

A portaria MA nº 205, de 13 de março de 1979 do Ministério da Agricultura, proíbe a comercialização, o transporte, a importação e a exportação de sementes e mudas de capim-annoni no Rio Grande do Sul (MEDEIROS & FOCHT, 2007).

A agressividade do capim-annoni se justifica por características como: alta persistência a cortes, pisoteio e geadas; alta capacidade de rebrota; baixa aceitabilidade pelos animais (REIS, 1993) e baixo valor nutritivo (NASCIMENTO & HALL, 1978); grande produção de sementes de tamanho pequeno e fácil dispersão (KISSMANN, 1991); ausência de inimigos naturais (REIS, 1993) e alelopatia (COELHO, 1986).

2.2 Alelopatia e os aleloquímicos

A alelopatia é definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencia o crescimento e desenvolvimento de outros organismos (IAS, 1996). As plantas alelopáticas podem agir por duas formas: a) heterotoxicidade: quando os aleloquímicos liberados de uma planta interferem sobre a germinação e o crescimento de outra planta e; b) autotoxicidade: quando há a produção de aleloquímicos que inibem a germinação e o crescimento de plantas da mesma espécie (WHITTAKER & FEENY, 1971).

Os metabólitos secundários que causam efeitos alelopáticos são chamados de aleloquímicos (RAZAVI, 2011) e são produzidos em diferentes órgãos da planta, incluindo folhas, caules, raízes e sementes (PARVEZ et al., 2003; WESTON & DUKE, 2003),

com quantidades variáveis de um órgão para outro (HONG et al., 2004). As folhas parecem ser as mais consistentes fontes de químicos envolvidos na alelopatia, enquanto poucas e menos potentes toxinas ocorrem nas raízes (REINHARDT & BEZUIDENHOUT, 2001). Os aleloquímicos são liberados por volatilização, lixiviação, exsudação radicial e decomposição de tecidos (INDERJIT & DAKSHINI, 1995). No ambiente, a toxicidade destes compostos varia em função da concentração, idade e estágio fenológico da planta, clima, estação do ano e componentes químicos, físicos e microbiológicos do solo (INDERJIT & WEINER, 2001; GNIAZDOWSKA & BOGATEK, 2005).

A melhor maneira de se descrever a natureza química dos aleloquímicos é a diversidade, pois estes variam desde simples hidrocarbonetos, como o etileno, até compostos complexos, como os policíclicos com pesos moleculares bastante elevados. Atualmente são conhecidos cerca de 10.000 compostos com ação alelopática, considerada apenas uma pequena parte da quantidade possivelmente existente na natureza (PIRES & OLIVEIRA, 2001).

Rice (1984) descreveu como principais classes de aleloquímicos: ácidos orgânicos solúveis em água, lactonas insaturadas simples, ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, fenóis simples, ácido benzóico e derivados, ácido cinâmico e derivados, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, terpenoides e esteroides, aminoácidos e polipeptídeos, alcaloides e cianoidrinas, sulfetos e glicosídeos, purinas e nucleosídeos. Embora os aleloquímicos possam pertencer a qualquer uma dessas classes, eles

geralmente pertencem aos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que são os principais responsáveis pela alelopatia (TREZZI, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Compostos fenólicos são a classe de maior importância e os aleloquímicos mais comuns nas plantas (LI et al., 2010). Esses compostos podem ser encontrados em grãos, pólen, exudatos de raiz, resíduos, matéria em decomposição e no solo (SÁNCHEZ-MOREIRAS et al., 2004). São liberados simultaneamente e continuamente, podendo agir sinergicamente (REIGOSA et al., 1999). Estes compostos tem origem da via do ácido chiquímico e da via do acetato-malato (SIMÕES et al., 2004) e podem ser divididos em flavonoides, taninos, cumarinas e ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem o ácido vanílico e siríngico, entre outros, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos incluem os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (FRIGHETTO & BACCAN, 2012).

Dentre os terpenos, os monoterpenos, constituintes frequentes dos óleos essenciais, estão mais correlacionados com os efeitos alelopáticos inibitórios (RICE, 1984). Destacam-se ainda as saponinas, que possuem propriedade detergente e, conseqüentemente, a capacidade de ligação a membranas celulares, afetando o funcionamento celular (RIZVI & RIZVI, 1992). Os alcaloides englobam mais de 12.000 estruturas já descritas. Aproximadamente 20% das espécies vegetais acumulam alcaloides, moléculas caracterizadas pelo baixo peso molecular e pela origem a partir de fenilalanina, tirosina, triptofano e lisina (SANTOS, 2012).

Os aleloquímicos podem tanto ter efeito isoladamente, como podem interagir sinergicamente ou antagonicamente com outras substâncias (GUSMAN et al., 2012). Depois de alcançarem a planta receptora, os aleloquímicos podem afetar: estruturas citológicas e ultra-estruturais; hormônios; membranas e sua permeabilidade; absorção de minerais; movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese (RIZVI & RIZVI, 1992); respiração; síntese de proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução; material genético, induzindo alterações no DNA e RNA (FERREIRA & AQUILA, 2000). Taninos atuam na extensão celular; cumarinas e terpenos voláteis atuam na divisão celular; ácidos fenólicos interferem na permeabilidade das membranas, síntese de proteínas, atividade enzimática e na fotossíntese (LEATHER & EINHELLIG, 1988; PINA, 2008).

Devido à diversidade de ação dos aleloquímicos em ambientes naturais, a alelopatia desempenha um importante papel na dominância, sucessão e formação de comunidades vegetais (CHOU, 1989), além de ser uma das estratégias importantes de colonização de muitas plantas invasoras sobre a comunidade natural (HIERRO & CALLAWAY, 2003). Por isso, as invasoras se tornam fontes promissoras de novas moléculas. Os estudos fitoquímicos nestas plantas fornecem uma grande variedade de novos compostos com efeitos alelopáticos, potenciais para desenvolvimento de herbicidas modelo (MACÍAS et al., 2008).

Considerando a utilização de produtos químicos em larga escala, os problemas ambientais, impactos na biota, riscos para a saúde humana (VYVYAN, 2002) e o crescimento de plantas

resistentes as moléculas sintéticas (DUKE et al., 2000; KRUSE et al., 2000), a pesquisa por substâncias naturais que não possuem as desvantagens dos herbicidas sintéticos é de fundamental importância (SOUZA FILHO et al., 2006). Produtos naturais com atividade biológica, incluindo atividade alelopática, são as principais fontes para novas estruturas químicas usadas no desenvolvimento de herbicidas (MACÍAS et al., 2008).

Um dos exemplos de aplicação de aleloquímicos no desenvolvimento de novas moléculas é o leptospermona, a partir do qual a classe de herbicidas tricetona foi desenvolvida. Este é talvez o mais bem sucedido caso de desenvolvimento de um herbicida comercial a partir de um aleloquímico (DUKE et al., 2000). Outro exemplo é a utilização do 1,4-cineol, um análogo estrutural do herbicida cinmetilina, que é um potente inibidor da asparagina sintetase (ROMAGNI et al., 2000).

No entanto, para ter sucesso na utilização das propriedades alelopáticas, a identificação dos aleloquímicos é necessária (BHADORIA, 2011). Para isso, duas ferramentas devem ser continuamente desenvolvidas para alcançar o objetivo: técnicas analíticas e bioensaios (MACÍAS et al., 2008). A preparação de extratos aquosos de partes de plantas e subsequentes testes de seus efeitos na germinação e crescimento de espécies alvo tem sido reconhecido como um processo clássico no campo da alelopatia (INDERJIT & DAKSHINI, 1995; BLUM, 2011). Apesar de ensaios de laboratório estabelecerem se uma planta tem potencial alelopático, estudos de campo são necessários para confirmar se o potencial

observado é expressado sob condições naturais (INDERJIT & DAKSHINI, 1995).

O desenvolvimento da ciência da alelopatia tem que acontecer em paralelo com avanços em técnicas de cromatografia e elucidação estrutural, especialmente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN) (MACÍAS et al., 2008), visto que a fitoquímica objetiva o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos vegetais, através do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (RODRIGUES et al., 2009).

O fato da família Poaceae ser uma das mais importantes e mais largamente utilizadas no mundo é uma das razões da extensa pesquisa sobre seus compostos alelopáticos. Os principais compostos identificados podem ser divididos em quatro grupos: ácidos fenólicos, ácidos hidroxâmicos, alcaloides e quinonas. Os ácidos fenólicos mais comuns são: *p*-hidroxibenzóico, siríngico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico, clorogênico, cafeico e gálico. Os alcaloides mais comuns são hordenina e gramina (SÁNCHEZ-MOREIRAS et al., 2004).

Embora o capim-annoni tenha efeito alelopático comprovado em trevo-branco (*Trifolium repens* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cornichão (*Lotus corniculatus* L.), grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé) e capim-kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach) (COELHO, 1986; FERREIRA et al., 2008; FAVARETTO et al., 2011) não há relatos sobre os compostos químicos presentes nesta gramínea.

2.3 Anatomia e histoquímica

2.3.1 Aspectos anatômicos de *Eragrostis* spp.

Eragrostis Wolf é um dos gêneros mais diversos da família Poaceae e carece de uma classificação subgenérica que facilite seu estudo (SANCHEZ & KOCH, 1998). As gramíneas pertencentes a este gênero são morfológicamente similares e há confusão na identificação e diferenciação das espécies baseadas na descrição morfológica. Dessa forma, estudos anatômicos são uma importante ferramenta para resolver os problemas taxonômicos da tribo (AHMAD et al., 2011), considerando que em *Eragrostis* há uma grande variabilidade na anatomia foliar (INGRAM, 2010).

Apenas a anatomia da lâmina foliar de *Eragrostis* spp. foi descrita. Este gênero caracteriza-se por possuir estômatos paracíticos, grandes e em forma de cúpula, corpos de sílica, células buliformes (1-2) no sulco adaxial e tricomas apenas na superfície abaxial (INGRAM, 2010). O colênquima possui disposição adaxial ou irregular, com células alargadas, redondas ou irregulares (SANCHEZ & KOCH, 1998) e pode estar disposto radialmente em volta dos feixes vasculares (INGRAM, 2010). Muitas espécies têm vigas de esclerênquima abaxial triangular ou trapezoidal associadas aos feixes vasculares secundários (INGRAM, 2010). Os feixes vasculares estão posicionados no centro da lâmina foliar, podendo ou não ocorrer feixes terciários. A bainha externa dos feixes primários é em forma de “U”, redonda ou semicircular e a bainha externa dos feixes secundários é triangular ou ovada (SANCHEZ & KOCH, 1998).

Todas as espécies de *Eragrostis* exibem anatomia Kranz, exceto *E. walteri* Pilg., da África do Sul, que possui anatomia C3 (ELLIS, 1984).

Embora exista descrição da anatomia foliar do gênero *Eragrostis*, caracteres anatômicos do capim-annoni não foram encontrados na literatura. No entanto, a anatomia vegetal fornece importantes contribuições à elucidação de relações ecológicas, taxonômicas e filogenéticas das plantas (SILVA & POTIGUARA, 2009) e, portanto, poderia ser útil para esclarecer a adaptação desta invasora em condições climáticas adversas, bem como sua rejeição pelos animais.

2.3.2 A anatomia vegetal e sua relação com o sucesso das plantas invasoras

Plantas invasoras, como o capim-annoni, possuem algumas características que asseguram o sucesso no processo de invasão, como rejeição pelos animais, baixo valor nutritivo, resistência a patógenos e capacidade de se estabelecer em solos compactados, pobres e secos. Muitas vezes, essas características estão relacionadas com a anatomia da planta.

Vários caracteres anatômicos ajudam a explicar o valor nutritivo das plantas. Dentre elas, destacam-se a proporção de tecidos e a espessura da parede celular, que apresentam altas correlações com os teores de fibra, de lignina e de proteína bruta (PB) e com o coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (CARVALHO & PIRES, 2008). Os microrganismos que habitam o

rúmen de alguns animais herbívoros possuem a capacidade de digerir a celulose e não a lignina. Portanto, diferenças na proporção de tecidos com lignina influenciam na qualidade das forragens (SILVA et al., 2005). Quanto maior a quantidade de lignina e maior a espessura da parede celular, menor a digestibilidade e a qualidade da forragem (CARVALHO & PIRES, 2008).

As gramíneas apresentam epiderme firmemente aderida ao resto da folha por uma estrutura em forma de viga, formada por porções do esclerênquima acima e abaixo do feixe vascular pela bainha do feixe vascular e pelo próprio feixe vascular (WILSON, 1994). Essa estrutura pode ser classificada como viga em forma de “I” ou em forma de “T” (WILSON, 1994). A estrutura de viga dificulta o desprendimento da epiderme do restante da folha, resultando em maior resistência da planta aos danos mecânicos, químicos e à digestão pelos ruminantes, devido ao espessamento e lignificação das células epidérmicas (PACIULLO, 2002). A resistência à digestão é maior em espécies que apresentam viga em forma de “I”, relativamente àquelas que apresentam viga em forma de “T” (WILSON, 1994).

Outro fator que influencia o valor nutritivo das plantas é o tipo de rota fotossintética. A digestão da bainha do feixe vascular das gramíneas C_4 é lenta ou incompleta, devido à sua parede celular espessada. Isto dificulta o acesso dos microrganismos ruminais aos nutrientes no interior das células, que contém mais de 50% das reservas de carboidratos e proteínas da folha (WILSON, 1994). Além disso, gramíneas C_4 possuem maior frequência de feixes vasculares que as C_3 . Isso faz com que as C_4 apresentem uma maior proporção de

tecidos menos digestíveis, como tecido vascular lignificado, esclerênquima e bainha do feixe vascular. As células de parede espessa e lignificada do tecido vascular são as principais responsáveis pela fração indigerível em todas as porções da planta (CARVALHO & PIRES, 2008).

A lignina, a cutícula, os corpos de sílica e os tricomas além de estarem relacionados à proteção contra herbívoros, constituem uma barreira contra fungos, bactérias e insetos (SILVA et al., 2005). A lignificação proporciona aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras da mesma, na difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno (SILVA et al., 2005).

Outra importante adaptação anatômica encontrada nas plantas é a formação de aerênquima (DANTAS et al., 2001). Aerênquima é o termo dado a tecidos de planta contendo grandes espaços de ar, excedendo aqueles comumente encontrados como espaços intercelulares (MALCOLM et al., 2000). Sua formação está associada com a hipóxia resultante do encharcamento, mas pode também ser causada por outras formas de estresse, incluindo altas temperaturas, seca, compactação do solo, deficiência de nutrientes e danos mecânicos (EVANS, 2003).

O aerênquima ocorre como dois tipos básicos: lisígeno e esquizógeno. A formação do aerênquima lisígeno envolve a morte celular, ou seja, células formadas durante o desenvolvimento morrem e são removidas, levando a formação de espaços de ar. Enquanto isso, o aerênquima esquizógeno é formado por diferenciação no

crescimento, com células adjacentes separando-se uma da outra na lamela média, sem que as células envolvidas morram (EVANS, 2003).

Outra estratégia empregada pelas plantas para sobreviver em condições climáticas adversas é o armazenamento de nutrientes. Neste caso, a planta armazena substâncias durante seu crescimento vegetativo para serem utilizadas em períodos de frio ou de seca e para rebrotar após um corte ou pastejo (CARVALHO & PIRES, 2008). Como exemplo pode-se citar a presença de amido em tecidos não-fotossintetizantes, onde ele é acumulado por períodos prolongados e mobilizado quando necessário para suportar a respiração e crescimento quando a área foliar e a fotossíntese diminuem após um corte (NELSON, 1995; ONG et al., 1994).

2.3.3 Histoquímica

A histoquímica consiste na determinação da natureza das substâncias químicas presentes nos tecidos e da sua localização. Para tanto, cortes anatômicos são submetidos a corantes biológicos, que são substâncias incolores ou coradas, orgânicas ou inorgânicas que, ao conferirem cor às estruturas celulares, permitem elucidar a sua natureza e estrutura química (FIGUEIREDO et al., 2007).

A histoquímica auxilia na identificação da composição de estruturas vegetais e de compostos do metabolismo primário e secundário, e contribui ainda na identificação dos vegetais (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000). Estudos histoquímicos são raros na alelopatia. No entanto, resultados destes testes podem servir como elemento de localização e identificação dos aleloquímicos

(RODRIGUES et al., 2009), que poderão ser quantificados, em função da intensidade da cor observada (SANTOS et al., 2009).

Em testes histoquímicos, geralmente são consideradas três principais classes de compostos: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (FUMAGALI et al., 2008). A biossíntese de alcaloides ocorre nos cloroplastos do mesófilo. Depois da síntese, os alcaloides são translocados via floema pela planta, onde acumulam-se principalmente nos tecidos da epiderme (BUSH & BURTON, 1994), mas também nos tricomas, mesófilo das folhas (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000), bainha parenquimática do feixe vascular, vacúolos (FIGUEIREDO et al., 2007) e, quando na forma de sais, nas paredes celulares (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). Os alcaloides podem ser rapidamente retranslocados para as sementes, sendo que as sementes maduras contêm a grande maioria dos alcaloides presentes na planta. A concentração de alcaloides aumenta nos tecidos vegetativos antes do florescimento (BUSH & BURTON, 1994).

Os compostos fenólicos podem estar presentes no tecido paliçádico, epiderme, elementos condutores (principalmente floema) (FERNANDES, 2007), no mesófilo foliar, colênquima, (COSTA et al., 2010), tricomas, bainha parenquimática (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008) e em ductos secretores (FONSECA et al., 2006). Taninos se distribuem por toda a planta, localizam-se nas células vivas, solubilizados nos vacúolos, na forma de combinações complexas e contribuem na formação das paredes celulares. Em plantas com alta concentração de taninos, esses podem ser encontrados em todas as regiões e tecidos, particularmente do córtex, floema e raios medulares

(COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000). Os flavonoides localizam-se nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, no parênquima e dissolvidos no suco celular sob a forma de heterosídeos (RODRIGUES et al., 2009).

Lipídios estão presentes na cutícula e nas paredes espessas das fibras associadas aos feixes (RODRIGUES et al., 2009), no tecido paliçádico, elemento de vaso, floema (FERNANDES, 2007), nas células do colênquima e na epiderme (COSTA et al., 2010). Os terpenoides possuem caráter lipídico e constituem uma das classes de metabólitos com vasta distribuição nas plantas. Acumulam-se preferencialmente em estruturas glandulares especializadas (tricomas, idioblastos, canais, bolsas e lactíferos), que secretam misturas mais ou menos complexas de terpenos (como os que ocorrem nos óleos essenciais, nas resinas e no látex), o que torna difícil a sua detecção histoquímica (FIGUEIREDO et al., 2007). Pertencendo a este grupo, as saponinas encontram-se nos tecidos parenquimáticos do córtex, floema e medula (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

O amido, também detectado pela histoquímica, pode ser encontrado no colênquima, parênquima (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008), ao redor do cilindro vascular e circundando os elementos condutores (FERNANDES, 2007).

Embora existam essas informações sobre a histolocalização de alguns aleloquímicos, sabe-se que a distribuição destes nas diferentes partes das plantas nem sempre é uniforme, havendo variações em função de aspectos relacionados à idade ou estágio fenológico (SOUZA FILHO et al., 2011). Há evidências que a localização dos aleloquímicos nas plantas está relacionada a dois

aspectos básicos: facilidade de liberação para o ambiente e função que podem desempenhar nas plantas, o que pode tornar seus efeitos mais imediatos e de maior magnitude. Dessa forma, substâncias envolvidas na defesa das plantas contra insetos estariam localizadas preferencialmente nos tecidos mais externos da planta, como os terpenoides, enquanto aqueles compostos químicos envolvidos na interação entre plantas estariam localizados nos tecidos mais internos, como os compostos fenólicos, sendo liberados apenas quando a sobrevivência das plantas estivesse ameaçada (SOUZA FILHO et al., 2011).

A localização dos aleloquímicos nas plantas influencia sua forma de liberação. Terpenoides, acumulados preferencialmente em glândulas, são liberados, geralmente, por volatilização. Os alcaloides solúveis em água e presentes nos tecidos mais externos da planta, como a epiderme, são lixiviados e portanto mais facilmente liberados do que aqueles compostos presentes nos tecidos mais internos da planta, como os ácidos fenólicos, que geralmente são liberados por decomposição de resíduos e de uma forma mais lenta (ALMEIDA et al., 2008).

CAPÍTULO I

AUTOTOXICIDADE EM CAPIM-ANNONI

(*Eragrostis plana* Nees)

Adriana Favaretto¹

RESUMO – A autotoxicidade do capim-annoni é observada em campo, mas nunca foi testada em bioensaios. Este trabalho avaliou o efeito de extratos aquosos de capim-annoni na germinação e crescimento inicial de plântulas da espécie. Os extratos de folhas verdes (FV), senescentes (FS) e raízes (R), nas concentrações de 0,05, 0,15 e 0,25 g.mL⁻¹, foram utilizados em bioensaios de germinação de sementes e de crescimento inicial das plântulas. Todos os extratos, independentemente do material de origem ou da concentração, diminuíram significativamente a geminabilidade, o índice de velocidade de germinação e o crescimento da raiz das plântulas. O efeito sobre o tempo médio de germinação, o percentual de plântulas anormais e mortas e o comprimento da parte aérea variou conforme a origem e concentração dos extratos, sendo os de FV 0,15 g.mL⁻¹ e FV 0,25 g.mL⁻¹ os mais prejudiciais. O capim-annoni possui efeito autotóxico e o grau de autotoxicidade varia de acordo com o material de origem e a concentração.

Palavras-chave: alelopatia, extratos aquosos, germinação, invasora.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia (ppgAGRO) da FAMV/UPF, área de concentração em Produção Vegetal.

AUTOXICITY IN TOUGH LOVEGRASS

(Eragrostis plana Nees)

ABSTRACT - The autotoxicity of the tough lovegrass is observed in the field, but has never been tested in bioassays. This study evaluated the effect of aqueous extracts of tough lovegrass on germination and seedling growth of the specie. The extracts of green leaves (LG), senescent leaves (LS) and roots (R) at concentrations of 0.05, 0.15 and 0.25 g.mL⁻¹, were used for bioassay seed germination and seedling growth. The extracts, regardless of the source or concentration material, significantly decreased geminability, the index of germination speed and root growth of seedlings of tough lovegrass. The effect on mean germination time, the percentage of abnormal and dead seedlings and shoot length varied according to origin and concentration of extracts. The LG 0.15 g.mL⁻¹ and LG 0.25 g.mL⁻¹ are the most damaging. The tough lovegrass has autotoxicity and the degree of effect depending on the source material and concentration.

Key-words: allelopathy, aqueous extracts, germination, weed.

1 INTRODUÇÃO

A alelopatia é o efeito que uma planta tem no desenvolvimento de outro organismo por meio da produção e liberação de compostos químicos no ambiente (RICE, 1984). A produção desses compostos do metabolismo secundário pode ocorrer em todos os órgãos da planta (PEREIRA et al., 2008) e é influenciada pela temperatura, luminosidade, condições do solo, microflora, nutrição, idade da planta, ataque de patógenos e herbivoria (BHADORIA, 2011). O efeito alelopático é classificado em dois tipos: (1) heterotoxicidade: a substância é fitotóxica para outra espécie; (2) autotoxicidade: a substância é fitotóxica para a própria espécie (MILLER, 1996).

A alelopatia favorece o impacto e sucesso de espécies invasoras em novos ambientes (MEINERS et al., 2012) e é apontada como uma das razões da elevada infestação do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) em ecossistemas. Esta espécie é a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil, causando prejuízos à pecuária do Estado e danos irrecuperáveis à biodiversidade.

A heterotoxicidade do capim-annoni foi observada em bioensaios de germinação de sementes de trevo-branco (*Trifolium repens* L.), azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam.), capim-kazungula (*Setaria sphacelata* (Schumach) Staff & C. E. Hubb ex Chipp) e grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé) (COELHO, 1986; FAVARETTO et al., 2011; FERREIRA et al., 2008). Supõe-se que o capim-annoni exiba autotoxicidade, pois, no campo, as touceiras

estão separadas umas das outras por espaços vazios de solo desnudo de 5-10 cm de raio (COELHO, 1986).

Este trabalho teve como objetivo verificar a autotoxicidade de extratos aquosos de folhas e raízes de capim-annoni na germinação e crescimento inicial de plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos utilizados nos bioensaios de germinação e crescimento foram preparados com material oriundo de plantas de capim-annoni, em estádio vegetativo, coletadas em abril de 2013, em Passo Fundo (28° 15'S, 52° 24'W).

As plantas foram separadas em folhas verdes (FV), folhas senescentes (FS) e raízes (R), secas em estufa de circulação forçada a 40 °C até peso constante e moídas. Foram preparados extratos aquosos (a fim de representar melhor as condições de campo) desses componentes, em três concentrações (0,05, 0,15 e 0,25 g.mL⁻¹), pelo método de maceração estática (SOARES & VIEIRA, 2000), no qual o material vegetal foi imerso em água destilada durante 24 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após esse período o material foi filtrado e caracterizado quanto ao pH (Tabela 1).

Dois bioensaios foram conduzidos: I) Germinação e II) Crescimento inicial. O bioensaio de germinação constou de dez tratamentos, resultado da combinação de três tipos de material vegetal, três concentrações e o controle (água destilada). O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. As unidades experimentais foram caixas gerbox contendo duas folhas de papel Germitest esterilizadas e umedecidas inicialmente com 5 mL de cada tratamento. Sempre que necessário, extratos foram aplicados novamente nas caixas a fim de manter a umidade das mesmas. Para quebrar a dormência das sementes, as mesmas foram submetidas a um tratamento de pré-esfriamento, em uma temperatura de 5 °C por 5 dias. Posteriormente, as caixas permaneceram em câmara de

germinação a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas durante dez dias. A contagem da germinação foi realizada diariamente. Foram consideradas germinadas sementes com 2 mm de protrusão radicial (FERREIRA & AQUILA, 2000). Foram avaliados a germinabilidade (G), o índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo médio de germinação (TMG) segundo recomendações de Ranal & Santana (2006), utilizando as seguintes fórmulas:

$$G: (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$$

Onde $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinar (N).

$$IVG: G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots G_n/N_n$$

Onde G_1, G_2, G_n é o número de sementes germinadas e N_1, N_2, N_n é o número de dias após a semeadura.

$$TMG: \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$$

Onde n_i é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo (t_i).

Tabela 1 – Caracterização dos extratos aquosos de capim-annoni quanto ao pH

Origem	Concentração (g.mL ⁻¹)	pH
Folha verde	0,05	6,2
	0,15	6,7
	0,25	7,0
Folha senescente	0,05	6,2
	0,15	6,2
	0,25	4,7
Raiz	0,05	5,8
	0,15	5,6
	0,25	5,0

No bioensaio de crescimento inicial de plântulas foram empregados os mesmos tratamentos, delineamento experimental e número de repetições do bioensaio de germinação. No entanto, em cada repetição foram utilizadas sete plântulas pré-germinadas em água destilada. Três dias após a germinação e antes da aplicação dos extratos foi mensurado o comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas, quando então, elas foram transferidas para as caixas gerbox contendo papel Germitest umedecido inicialmente com 5 mL de cada tratamento, aonde permaneceram por 15 dias. As caixas foram dispostas em câmaras de germinação nas mesmas condições descritas no bioensaio de germinação. Ao final do experimento, mensurou-se novamente o comprimento da raiz e da parte aérea. Realizou-se a contagem de plântulas normais, anormais e mortas, seguindo critérios descritos em Brasil (2009b).

Os dados de comprimento da raiz e parte aérea foram expressos em percentual de inibição, segundo a fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = [(\bar{X}_T - \bar{X}_C) / \bar{X}_C] \times 100$$

Onde \bar{x}_t é a média de alongamento dos tratamentos e \bar{x}_c a média de alongamento do controle. O valor “0” representa o controle. Qualquer valor positivo implica em estimulação dos parâmetros medidos e os valores negativos inibição (OLIVEIRA et al., 2012). Os resultados atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, e foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

A fim de verificar se a concentração dos extratos utilizados nos bioensaios corresponde à concentração de folhas e

raízes de capim-annoni presentes no campo, no ano seguinte, plantas foram coletadas em uma área amostral de 400 cm^2 , separadas em folhas e raízes e secas em estufa. Foi estimado 8.000 kg ha^{-1} de massa seca de folhas (MSF), o que equivale a $0,08 \text{ g.cm}^2$ de MSF e 7.500 kg ha^{-1} de massa seca de raízes (MSR), equivalente a $0,07 \text{ g.cm}^2$ de MSR. Nas caixas gerbox, a quantidade utilizada foi de $0,0019 \text{ g.cm}^2$ de MSF e MSR para a concentração de $0,05 \text{ g.mL}^{-1}$, $0,0059 \text{ g.cm}^2$ de MSF e MSR para a concentração de $0,15 \text{ g.mL}^{-1}$ e $0,0098 \text{ g.cm}^2$ de MSF e MSR para a concentração de $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi a primeira investigação acerca da atividade autotóxica do capim-annoni e permitiu comprovar este efeito na germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas, refletindo o que é observado no campo, onde as touceiras de capim-annoni ficam distantes umas das outras.

3.1 Bioensaio de germinação

Os extratos aquosos de capim-annoni afetaram a germinação das sementes. Como esses extratos estão dentro dos valores normais de pH (entre 4,0 e 7,0) (OLIVEIRA et al., 2012), descarta-se a possibilidade deste fator ter sido responsável por alterações no comportamento germinativo da espécie.

Todos os extratos reduziram a germinabilidade do capim-annoni. Os extratos FS 0,15, R 0,05, R 0,25, FV 0,15 e FV 0,25 g.mL⁻¹ não diferiram entre si e foram os mais prejudiciais à germinação (Figura 1). A germinabilidade é um parâmetro considerado pouco sensível à presença de aleloquímicos (OLIVEIRA et al., 2012), o que indica o elevado efeito autotóxico dos extratos utilizados nesse bioensaio.

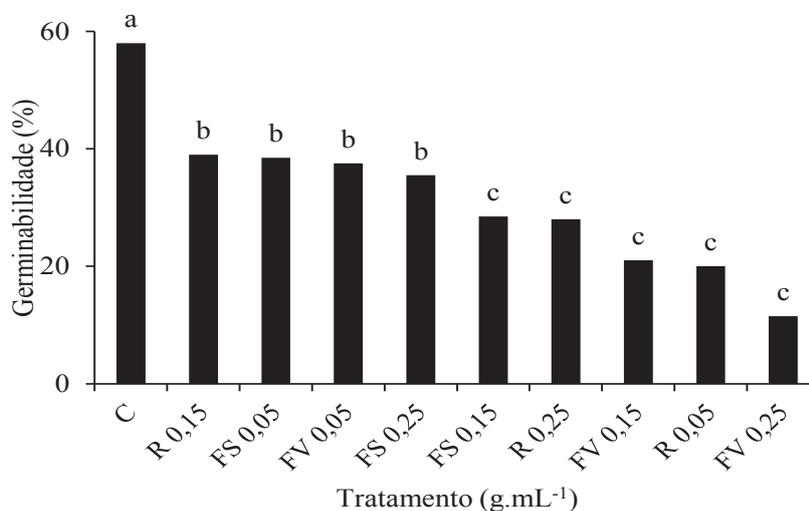


Figura 1 - Germinabilidade de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

O IVG foi reduzido pelos extratos quando comparado ao controle. Os extratos de FV 0,25 e FV 0,15 g.mL⁻¹ foram os que causaram o menor valor de IVG (Figura 2). O TMG somente foi influenciado pelos extratos de FV 0,25 e FV 0,15 g.mL⁻¹, sendo o FV 0,25 g.mL⁻¹ o mais prejudicial (Figura 3). O TMG é um parâmetro sensível à presença de aleloquímicos, pois muitos compostos permitem que a semente germine, mas com um pequeno atraso (OLIVEIRA et al., 2004).

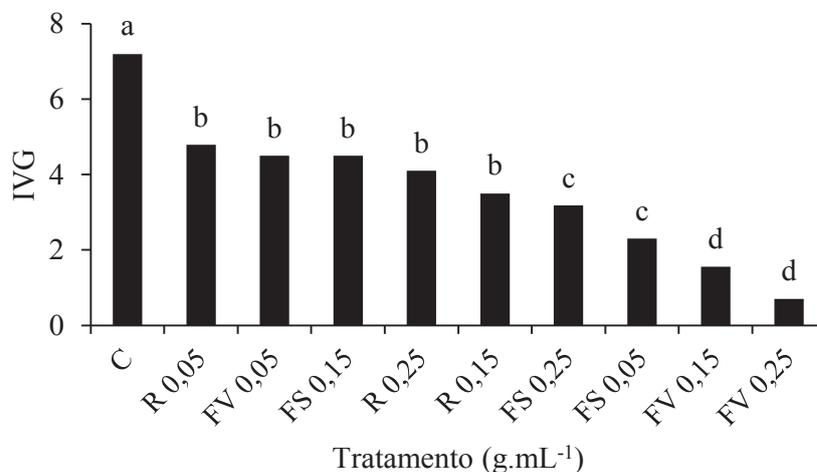


Figura 2 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

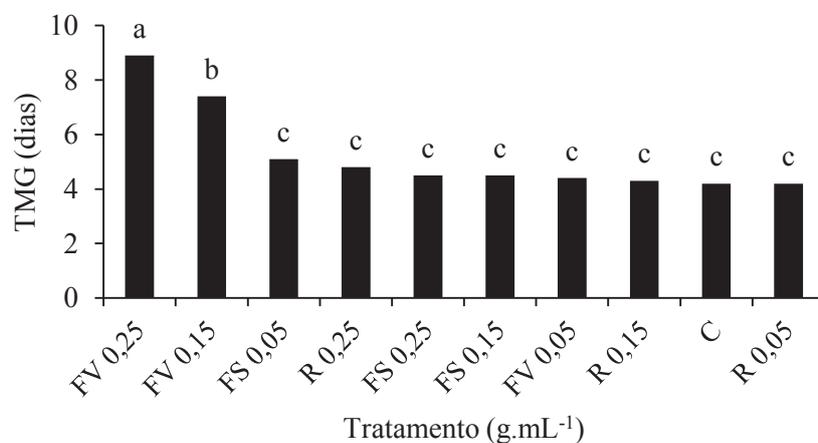


Figura 3 – Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

3.2 Bioensaio de crescimento inicial

Extratos de folha verde, folha senescente e raiz de capim-annoni tiveram efeito no número de plântulas normais, anormais e mortas. A maior mortalidade das plântulas foi causada pelo extrato FV 0,25 g.mL⁻¹, seguido pelo extrato FV 0,15 g.mL⁻¹ (Figura 4). Consequentemente, esses dois extratos foram os que apresentaram o menor número de plântulas vivas (Figura 5). Os extratos de FS 0,05; FS 0,15, R 0,15 e R 0,25 g.mL⁻¹ não diferiram do controle em relação ao número de plântulas anormais (Figura 6).

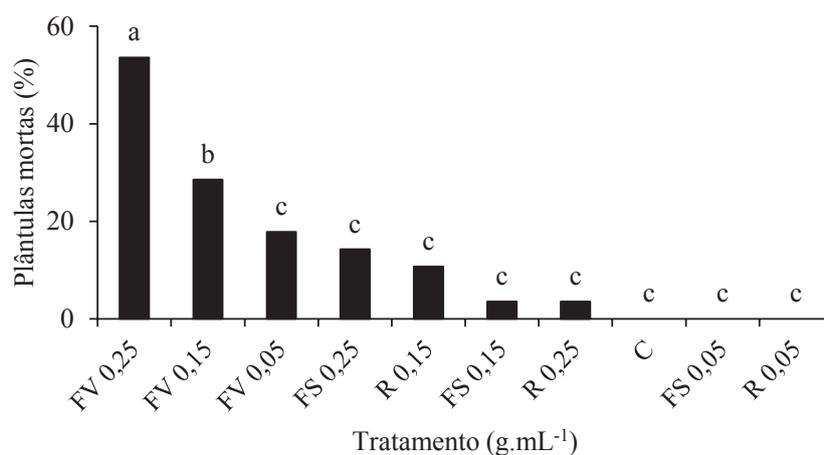


Figura 4 – Percentual de mortalidade de plântulas de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

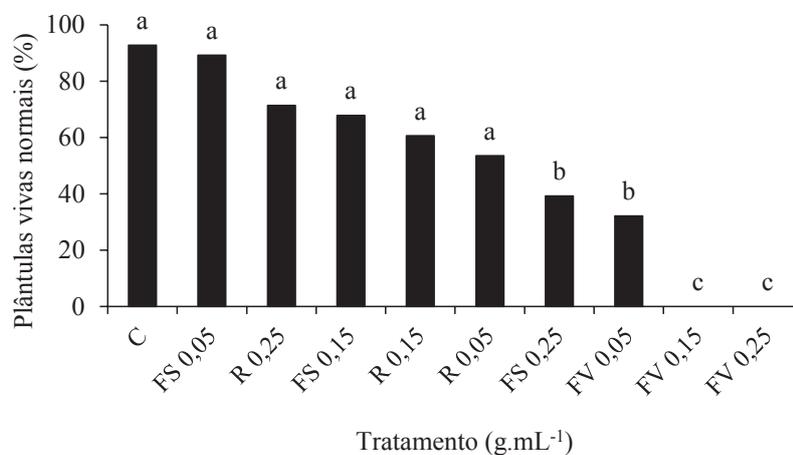


Figura 5 – Percentual de plântulas vivas normais de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

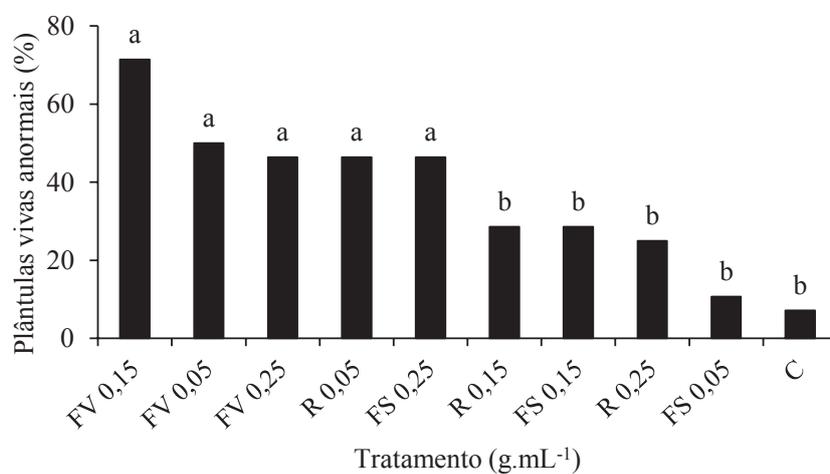


Figura 6 - Percentual de plântulas vivas anormais de capim-annoni submetidas a distintas concentrações de extratos aquosos de raiz (R), folha verde (FV) e folha senescente (FS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Passo Fundo, setembro de 2013.

A avaliação do crescimento das plântulas é um instrumento valioso, uma vez que os aleloquímicos induzem o aparecimento de plântulas anormais (FERREIRA & AQUILA, 2000). Os aleloquímicos podem afetar as estruturas citológicas, hormônios, permeabilidade das membranas, absorção de minerais, movimento dos estômatos, síntese de pigmentos, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática, relações hídricas e causar alterações no DNA e RNA (FERREIRA & AQUILA, 2000; RIZVI & RIZVI, 1992). Neste trabalho, as principais anormalidades encontradas nas plântulas de capim-annoni foram: raízes necróticas, escuras, finas e retorcidas, ausência de raízes secundárias, necrose e clorose na parte aérea (Figura 7).

O sistema radicial é a estrutura vegetativa em que mais se observa o processo alelopático e efeito inibitório (YAMAGUSHI et al., 2011). Entre todas as anormalidades, a necrose da raiz é um dos sintomas mais comuns (FERREIRA & AQUILA, 2000). Além desse sintoma, pode-se observar ondulação do eixo radicial, descoloração e ausência de pelos radiciais (BHADORIA, 2011). A presença de escurecimento e a fragilidade nas raízes são danos que indicam a ação de substâncias tóxicas dos extratos e são evidências de alterações morfológicas e anatômicas causadas por fitotoxinas (YAMAGUSHI et al., 2011).



Figura 7 – Anormalidades encontradas em plântulas de capim-annoni submetidas aos extratos aquosos de folhas verdes, folhas senescentes e raízes. A: controle; B: plântula com clorose na parte aérea (FV 0,25 g.mL⁻¹); C: plântula com necrose na parte aérea (FV 0,15 g.mL⁻¹); D: raízes escuras e ausência de raízes secundárias (R 0,25 g.mL⁻¹); E: raiz retorcida (FV 0,15 g.mL⁻¹). Passo Fundo, agosto de 2013. Fotos do autor.

Nos estudos com aleloquímicos, a clorose tem sido relacionada como um dos mecanismos de interferência destas substâncias sobre as plantas. Einhellig (1986) verificou que, seis dias após o tratamento de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) com os ácidos ferúlico, p-cumárico e vanílico, as plantas apresentavam menos clorofila na folha do que as plantas do tratamento controle.

Os extratos de capim-annoni utilizados neste trabalho influenciaram o crescimento da raiz e parte aérea da própria planta (Figura 8). A raiz foi o órgão mais prejudicado, o que se justifica em função do maior contato dessa estrutura com o extrato vegetal. Possivelmente, a presença de aleloquímicos tenha inibido ou reduzido atividades metabólicas, alterando a fisiologia da protusão radicial (CHUNG et al., 2001).

Apenas os extratos de FV 0,15 g.mL⁻¹, FV 0,25 g.mL⁻¹ e FS 0,05 g.mL⁻¹ inibiram significativamente o crescimento da parte aérea das plântulas de capim-annoni. Porém, todos os extratos causaram redução significativa no crescimento da raiz (Figura 8).

Tanto no bioensaio de germinação quanto no de crescimento inicial, o extrato de folha verde foi o mais autotóxico. Como a folha é o órgão da planta mais ativo metabolicamente, é razoável que ela apresente maior diversidade de aleloquímicos e, conseqüentemente, maior efeito alelopático (RIBEIRO et al., 2009). O potencial fitotóxico dos extratos pode variar também em função da concentração da solução testada. A ação dos aleloquímicos não é muito específica e a mesma substância pode realizar várias funções, dependendo de sua concentração e forma de translocação (MARASCHIN-SILVA & AQUILA, 2005).

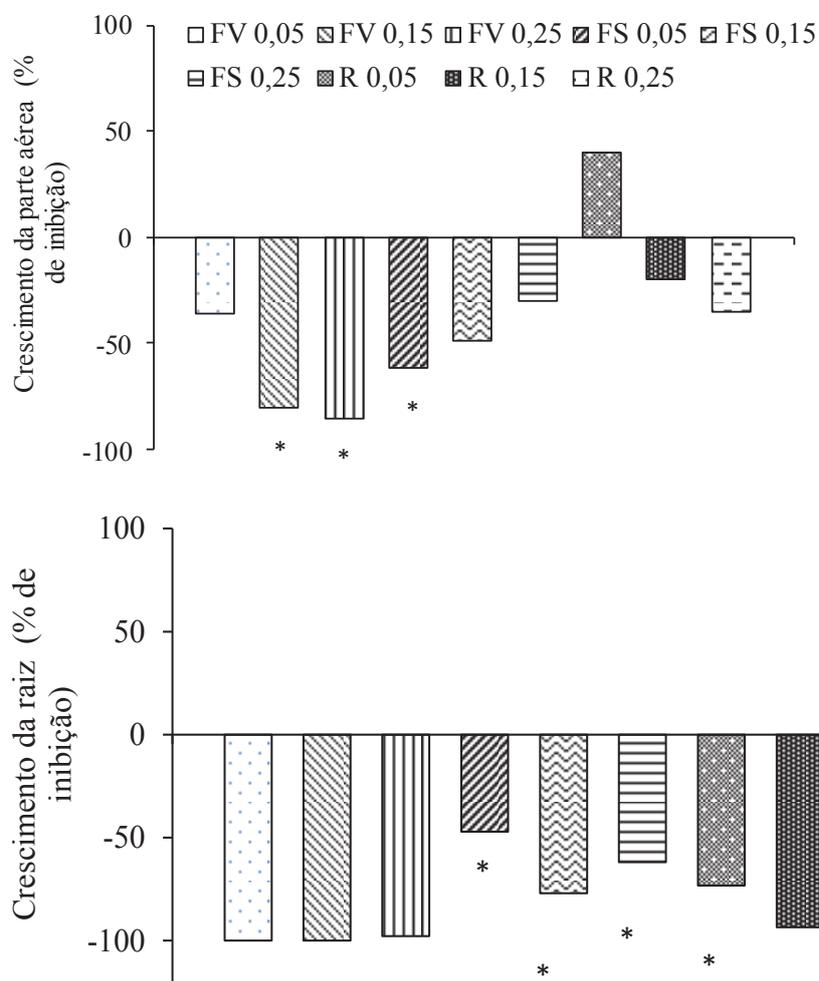


Figura 8 - Percentual de inibição e/ou estímulo do crescimento da raiz e parte aérea das plântulas de capim-annoni crescidas sob influência de distintas concentrações de extratos aquosos de folhas e raízes da mesma espécie. * indica diferença significativa em relação ao controle. Passo Fundo, setembro de 2013.

Para avaliação da autotoxicidade, recomenda-se que os extratos sejam preparados em concentrações compatíveis com aquelas nas quais as plantas encontram-se no ambiente natural (REIGOSA et al., 2013). No entanto, as concentrações de extratos utilizadas neste

trabalho foram superiores à quantidade de material existente no campo. A quantidade de MS de capim-annoni presente na área em que as plantas foram coletadas para este estudo superam as concentrações de 0,05, 0,15 e 0,25 g.mL⁻¹ de extrato, respectivamente, em 8, 13 e 42 vezes a quantidade de folhas e em 7, 12 e 37 vezes a quantidade de raízes. Isso indica que em condições naturais, o potencial alelopático do capim-annoni seria mais pronunciado do que o que foi verificado neste estudo.

A autotoxicidade do capim-annoni é um mecanismo que, possivelmente, esteja envolvido no controle da germinação e crescimento de plantas da própria espécie, o que explicaria a distância entre suas touceiras no campo. No entanto, é essencial que este efeito seja verificado em ensaios no campo (PEREIRA et al., 2008), para determinar se variáveis climáticas, edáficas, estágio fenológico, longevidade de ação dos compostos inibitórios no solo e quantidade de material vegetal afetam a germinação e o crescimento inicial do capim-annoni. Como os aleloquímicos são compostos com potencial de utilização como herbicidas e, considerando o efeito autotóxico do capim-annoni, as substâncias isoladas dessa planta poderiam ser testadas para o seu próprio controle.

A comprovar o efeito autotóxico do capim-annoni, também em condições naturais, seria possível inferir sobre o manejo das roçadas. Restos de capim-annoni provenientes dessa prática, se deixados sobre as pastagens ou áreas invadidas pela gramínea, seriam uma forma de supressão da germinação e do crescimento das plântulas, podendo reduzir sua expansão, tendo em vista que a autototoxicidade desempenha um papel importante no controle da

densidade populacional em sistemas naturais (HE et al., 2009). Por outro lado, como a espécie possui efeito alelopático sobre outras plantas, o material que permanece no solo poderia também inibir o crescimento destas. Assim, a decisão sobre esta prática de manejo deveria levar em consideração a presença de outras espécies junto ao capim-annoni.

4 CONCLUSÕES

Extratos aquosos de folhas e raízes de capim-annoni afetam negativamente a germinação e o crescimento inicial de plântulas da mesma espécie. O grau de autotoxicidade varia de acordo com o material de origem e a concentração.

CAPÍTULO II

PERFIL FITOQUÍMICO DO CAPIM-ANNONI

(*Eragrostis plana* Nees)

Adriana Favaretto¹

RESUMO – O estudo objetivou identificar as principais classes de aleloquímicos em folhas e raízes do capim-annoni, bem como validar metodologia analítica para detecção e quantificação de compostos fenólicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, vanílico e a cumarina (1,2-benzopirona), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Análises fitoquímicas preliminares foram realizadas por meio de testes gerais de identificação e cromatografia em camada delgada (CCD). Durante a validação dos métodos por CLAE, foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Testes gerais de identificação evidenciaram a presença de saponinas, alcaloides e flavonoides em folhas e raízes de capim-annoni e taninos somente em folhas. Pela CCD foram detectados alcaloides e saponinas, sendo que a presença de cumarinas, flavonoides e taninos não pode ser claramente visualizada. Verificou-se a presença, através da CLAE, de cumarina, na mesma quantidade em folha e raiz, ácido ferúlico, em maior quantidade na raiz, ácido cafeico, p-cumárico e vanílico, em maiores quantidades na folha, e catequina e epicatequina,

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia (ppgAGRO) da FAMV/UPF, área de concentração em Produção Vegetal.

somente na folha. O método analítico proposto por CLAE mostrou-se seletivo, linear, exato, preciso e robusto. Os compostos identificados podem estar relacionados com a atividade alelopática dessa gramínea.

Palavras-chave: aleloquímicos, compostos fenólicos, fitoquímica.

PHYTOCHEMICAL PROFILE OF TOUGH LOVEGRASS (*Eragrostis plana* Nees)

ABSTRACT - The study aimed to identify the main classes of allelochemicals in leaves and roots of the tough lovegrass and validate analytical methods for detection and quantification of phenolic compounds, such as caffeic acid, ferulic, p-coumaric, vanillic and coumarin (1,2-benzopyrone), by high performance liquid chromatography (HPLC). Preliminary phytochemical analysis were performed by means of general identification tests and thin layer chromatography (TLC). During the validation of HPLC methods, parameters specificity, linearity, limit of detection and quantification, precision, accuracy and robustness were evaluated. It was developed and validated a method for separation and quantification of acids caffeic, ferulic, p-coumaric and vanillic and other method for for separation and quantification of coumarin by HPLC. Besides these substances, catechin, epicatechin, gallic acid, rutin, quercetin and kaempferol were tested. General identification tests showed the presence of saponins, alkaloids and flavonoids in leaves and roots of tough lovegrass and tannins in leaves only. Through the TLC, alkaloids and saponins were detected and the presence of coumarins,

flavonoids and tannins can't be clearly displayed. We verified, by HPLC, the presence of the same amount of coumarin in root and leaf, ferulic acid in higher quantities in the root, caffeic acid, p-coumaric and vanillic in higher quantities in the leaf, catechin and epicatechin only in the leaf. The analytical method proposed by HPLC proved to be selective, linear, accurate, precise and robust. The compounds identified may be related to allelopathic activity of this grass.

Key-words: allelochemicals, phenolics, phytochemical.

1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é uma gramínea africana responsável por causar impactos econômicos na pecuária do RS, por modificar a estrutura da comunidade vegetal e alterar seu equilíbrio, tornando-se assim a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil (MEDEIROS & FOCHT, 2007).

Possivelmente, o efeito alelopático inibitório dessa espécie seja um dos fatores decisivos para o sucesso da invasão (MEDEIROS & FOCHT, 2007). Este efeito foi evidenciado em trevo-branco (*Trifolium repens* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cornichão (*Lotus corniculatus* L.), grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé) e capim-kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach) (COELHO, 1986; FERREIRA et al., 2008; FAVARETTO et al., 2011). Há diferença no potencial alelopático de folhas e raízes de capim-annoni, sugerindo distinta composição química e/ou concentração de aleloquímicos nesses órgãos (FAVARETTO et al., 2011). No entanto, não há relatos a respeito dos aleloquímicos presentes nessa gramínea.

A maioria dos aleloquímicos descritos na literatura pertence à classe dos terpenos, compostos fenólicos e/ou alcaloides (TREZZI, 2002). Entre os compostos fenólicos destacam-se os ácidos fenólicos, podendo ser citado o ácido cafeico, p-cumárico (TANVEER et al., 2012), ferúlico e vanílico (CHOU, 1989); destacam-se também as cumarinas em geral (RAZAVI, 2011), o ácido gálico, um ácido orgânico que faz parte da estrutura dos taninos hidrolisáveis (ALVES et al., 1999), os monômeros de taninos condensados catequina e epicatequina (LÔBO et al., 2008) e os flavonoides, entre estes os

flavonóis canferol, rutina e quercetina (SANTOS et al., 2011). Dentre os alcaloides, destacam-se gramina, um alcaloide indólico, e hordenina, um alcaloide da classe das fenetilaminas (HOULT & LOVETT, 1993). Além disso, podem ser citados como glicosídeos de terpenos policíclicos, as saponinas em geral (WAIBEL et al., 2003).

Plantas alelopáticas são potenciais fontes de novas moléculas com ação herbicida. O interesse nessas substâncias está aumentando consideravelmente, tendo em vista o crescimento de plantas resistentes às moléculas já existentes, os problemas ambientais causados pelos herbicidas sintéticos (DUKE et al., 2000; KRUSE et al., 2000) e o fato de que os compostos naturais frequentemente tem novos sítios de ação, diferente dos herbicidas comerciais, o que pode ser muito valioso no desenvolvimento de herbicidas (DUKE et al., 2000).

No entanto, para avanços em termos tecnológicos e aumento da aplicabilidade dos resultados da alelopatia, é necessário identificar os aleloquímicos com potencial para serem usados como reguladores de crescimento e herbicidas (DAYAN & DUKE, 2006). Neste contexto, a fitoquímica tem um importante papel, pois objetiva o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos vegetais (RODRIGUES et al., 2009).

Dessa forma, objetivou-se identificar, por meio de diferentes testes fitoquímicos, os principais aleloquímicos em folhas e raízes do capim-annoni, bem como validar metodologia analítica para detecção e quantificação de compostos fenólicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, vanílico e a cumarina, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas três diferentes técnicas para determinar o perfil fitoquímico do capim-annoni: testes gerais de identificação, CCD e CLAE, para a qual foi necessária a validação de um método analítico de quantificação.

2.1 Coleta do material vegetal

Plantas em estágio vegetativo foram coletadas em área dominada por capim-annoni, no campo experimental da Universidade de Passo Fundo (UPF), em abril de 2013. Uma excisata do material coletado foi depositada no herbário da UPF (RSPF) sob número 11832. Após a separação em folhas e raízes, o material foi seco a 40 °C em estufa com ventilação forçada até obtenção de peso constante.

2.2 Testes gerais de identificação

A metodologia seguiu recomendações de Matos (2009) e Simões et al. (2004) (Tabela 1). Para detecção de alcaloides, 1 g de material vegetal foi extraído por decocção com 20 mL de ácido sulfúrico 1%, durante 5 minutos. A seguir procedeu-se a filtração em algodão, sendo o filtrado alcalinizado com 1 mL de hidróxido de amônio concentrado. Adicionou-se ao filtrado 15 mL de água destilada e realizaram-se extrações líquido-líquido com duas porções sucessivas de 15 mL de clorofórmio. Depois de evaporado em banho-

maria, o resíduo foi redissolvido em 5 mL de ácido sulfúrico e submetido aos reagentes específicos (Tabela 1).

Para detecção de antraquinonas, 0,5 g de material vegetal foi submetido à extração com 20 mL de clorofórmio por 15 minutos, em temperatura ambiente. Com o filtrado procedeu-se a reação de Borntraeger, que consiste em alcalinizar o mesmo com hidróxido de amônio diluído e observar a coloração formada. Na presença de derivados 1,8-diidroxiantraquinonas forma-se coloração róseo-avermelhada.

Para avaliar a presença de flavonoides, 1 g da droga vegetal foi fervido em banho-maria com 20 mL de etanol 75%. Depois de resfriado, o filtrado foi submetido à reação oxalo-bórica, que consiste em preparar um resíduo a partir deste filtrado, acrescentar solução de ácido bórico 3% e solução de ácido oxálico 10% (em etanol 75%), evaporar até a secura em bico de bunsen, acrescentar éter etílico e observar a fluorescência sob luz UV 365nm.

Para avaliação de taninos, 1 g do material vegetal foi extraído com 20 mL de água, em banho-maria por 20 minutos. Depois de resfriada, a mistura foi filtrada em algodão e submetida às reações específicas. Foram utilizadas soluções de gelatina 1% em meio ácido, cloreto férrico 5% metanólico e acetato de chumbo 10% aquoso.

As saponinas foram determinadas pela técnica do índice de espuma. Para isso, 1 g do material vegetal foi submetido à extração por decocção com 50 mL de água destilada, por 30 minutos, filtrado para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada. Este decocto foi transferido para tubos de ensaio, de iguais dimensões, em séries sucessivas de 1, 2, 3 até 10 mL. O volume

de líquido de cada tubo foi ajustado até 10 mL. Os tubos foram uniformemente agitados durante 15 segundos, com duas agitações por segundo e, após um período de repouso de 15 minutos, observou-se a formação de espuma e mediu-se a altura da espuma formada. A partir disso, calculou-se o índice afrosimétrico segundo a equação $1000/A$, sendo A o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada (FARMACOPÉIA, 2010).

Tabela 1 – Testes gerais de identificação de grupos químicos (Modificado de MATOS, 2009 e SIMÕES et al., 2004)

Grupo químico	Reação	Resultado positivo
Alcaloides	Dragendorff	Formação de precipitado
	Mayer	Formação de precipitado
	Bertrand	Formação de precipitado
	Bouchardat	Formação de precipitado
Antraquinonas	Borntraeger	Coloração alaranjada ou róseo-avermelhada
Flavonoides	Oxalo-bórica	Fluorescência amarelo-esverdeada sob luz UV 365 nm
Taninos	Gelatina	Formação de precipitado
	Sais de ferro	Precipitados de coloração verde ou azul
	Acetato de chumbo	Formação de precipitado
Saponinas	Índice de espuma	Presença de espuma

2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O material vegetal seco e moído foi submetido à extração com metanol 50% na proporção 1:10 (planta:solvente), em temperatura ambiente, por dez dias. Após o período de maceração, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob

pressão reduzida até a obtenção de extratos moles. Estes foram ressuspensos em 20 mL de água destilada e, em seguida, submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo-se os respectivos extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol (Figura 1).

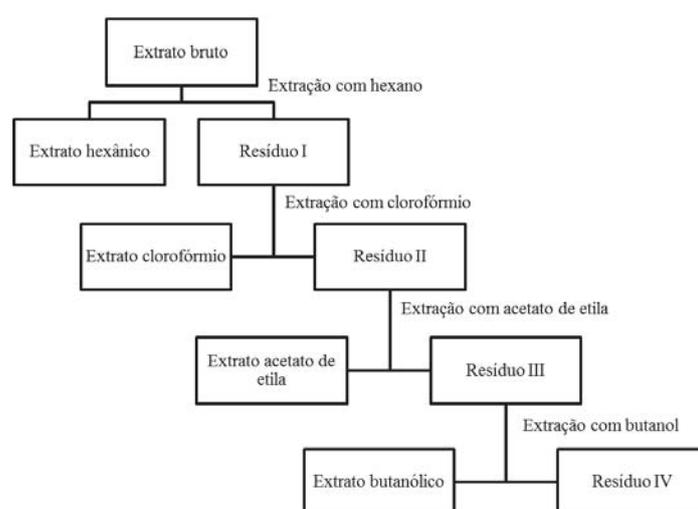


Figura 1 – Organograma representando a partição com solventes de polaridade crescente em extratos brutos hidrometanólicos de folhas e raízes de capim-annoni.

Com o auxílio de tubos capilares de vidro, os extratos obtidos das partições líquido-líquido foram aplicados em cromatoplasas de gel de sílica F254 (Merck), juntamente com substâncias químicas de referência (SQRs) (Sigma-Aldrich). A fim de detectar a presença de vários grupos químicos, foram utilizadas diversas fases móveis e reveladores específicos (Tabela 2). Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz de ultravioleta

(UV) a 254 nm e 365 nm. A seguir, as mesmas foram reveladas com os reveladores específicos para cada classe de substâncias (WAGNER et al., 2001).

Tabela 2 – Condições cromatográficas empregadas na análise de grupos químicos por meio de CCD

Grupo químico	SQR	Fase móvel	Revelador
Alcaloides	quinina pilocarpina cafeína	tolueno:acetato de etila (95:5)	Reagente de Dragendorff
Cumarinas	cumarina	acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:10)	Hidróxido de potássio 5% em etanol
Taninos	ácido gálico catequina	acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10)	Cloreto férrico 5% em metanol
Saponinas	ácido ursólico	acetona:tolueno:ácido fórmico (30:30:10)	Vanilina sulfúrica + aquecimento
Flavonoides	rutina quercetina canferol	acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10)	NP-PEG*

* difenilboriloxietilamina 1% em metanol, seguido de polietilenoglicol 4000, solução a 5% em etanol.

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.4.1 Extração

Os extratos aquosos foram obtidos a partir de 300 g de material vegetal seco e moído. Utilizou-se uma proporção de 100 mL de água destilada para cada 10 g de material vegetal. A extração foi realizada através de turboextração com posterior liofilização

(liofilizador Interprise K2504/Terroni). Após liofilizados, os extratos foram armazenados a -5 °C.

2.4.2 Reagentes

As substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas foram: catequina (99%, Sigma Aldrich, lote BCBC2740), epicatequina (99%, Sigma Aldrich, lote BCBC8078V), ácido gálico (99%, Sigma Aldrich, lote 54705138), rutina (99%, Sigma Aldrich, lote BCBD8327V), quercetina (99%, Sigma Aldrich, lote 060M1196V), canferol (99%, Sigma Aldrich, lote BCBD1168), gramina (99%, Sigma Aldrich, lote 00514CV), hordenina ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, lote BCBB8693V), cumarina ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, lote 030M1441V), ácido vanílico ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, lote BCBF7869V), ácido ferúlico (99%, Sigma Aldrich, lote STBC5005V), ácido p-cumárico ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, lote 091M1197V) e ácido cafeico ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, lote SLBB5479V). Para o preparo das fases móveis foi utilizada água ultrapurificada obtida pelo Sistema Directi-Q – Millipore®/Millipore Corporation (EUA), acetonitrila e metanol grau HPLC e ácido fosfórico e acético grau PA.

2.4.3 Preparo das amostras e soluções-SQR

As soluções das SQRs contendo $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 0,1 g de cada SQR em balão volumétrico com 100 mL de metanol. Estas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Os extratos liofilizados de folhas e raízes foram ressuspensos em metanol na concentração de 50 mg.mL^{-1} e filtrados em membrana de nylon de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

2.4.4 Equipamentos e condições cromatográficas

Para otimização das condições cromatográficas foram testados os comprimentos de onda máximos de absorção de cada SQR em espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 20, Perkin Elmer) na faixa de 200 a 500 nm.

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Flexar LC Perkin Elmer (Burnsville, MN, USA), equipado com bomba binária Flexar LC, detector Flexar PDA em 280 e 274 nm, auto-amostrador. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se Software Chromera Workstation. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C_{18} ACE (250 x 4,6 mm). No cromatógrafo foram injetadas alíquotas de $20 \text{ }\mu\text{L}$.

Diversas combinações de fluxo e fase móvel, compostas por água (acidificada ou não) e acetonitrila, também foram testadas a fim de determinar a melhor fase móvel e fluxo para cada SQR.

2.4.5 Validação do método

Para as SQRs catequina, epicatequina, ácido gálico, rutina, quercetina e canferol foi utilizado um método previamente desenvolvido e validado por Chini (2013). Para as demais SQRs presentes nos extratos, o método foi validado de acordo com os

parâmetros descritos pela *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção e robustez.

2.4.6 Seletividade

A seletividade do método para cada SQR foi avaliada a partir da pureza do pico através do detector de arranjo de diodos (PDA), calculada pelo software Chromera Flexar.

2.4.7 Linearidade, limites de detecção e de quantificação

A linearidade do método foi determinada mediante a construção de três curvas de calibração, contendo 5 concentrações de cada SQR. Foi utilizado o intervalo de 40-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As concentrações foram plotadas *versus* as áreas dos picos dos cromatogramas. As curvas de calibração foram submetidas à análise de regressão, pelo método dos mínimos quadrados, para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). Os dados das três curvas foram analisados por ANOVA ($p < 0,05$).

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):

$$LD = DP_a \times 3/IC$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC$$

Aonde: DP_a é o desvio padrão do intercepto de três curvas de calibração contendo concentrações da SQR; e IC é a inclinação da curva de calibração.

2.4.8 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do preparo de nove soluções das SQRs, contemplando três concentrações: baixa ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($140 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($180 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com três repetições 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:

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

2.4.9 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intra-dia), na qual foram preparadas seis amostras contendo $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada SQR. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e a precisão foi expressa em porcentagem do desvio padrão relativo (DPR).

2.4.10 Robustez

A robustez foi determinada através da análise de pequenas mudanças na fase móvel, como fluxo (0,98 e 1,02 mL min⁻¹) e pH (3,37 e 3,43) de soluções das SQRs na concentração de 40 µg.mL⁻¹, em triplicata.

2.4.11 Análise estatística

Os extratos foram injetados em triplicata e os dados referentes às injeções foram submetidos à ANOVA, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

3.1.1 Análise fitoquímica por testes gerais de identificação e CCD

Os testes gerais de identificação permitiram detectar a presença de alcaloides, flavonoides e saponinas em folhas e raízes, e taninos somente nas folhas de capim-annoni (Tabela 3). Através da partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente foi possível realizar uma semi-purificação do extrato bruto, com o objetivo de facilitar a visualização por CCD dos diferentes compostos presentes no extrato (Figuras 2 e 3).

Tabela 3 – Resultado dos testes gerais de identificação em folhas e raízes de capim-annoni

Grupo químico	Reação	Folha	Raiz
Alcaloides	Dragendorff	+	+
	Mayer	+	+
	Bertrand	+	+
	Bouchardat	+	+
Antraquinonas	Borntraeger	-	-
Flavonoides	Oxalo-bórica	+	+
	Gelatina	+	-
Taninos	Sais de ferro	+	-
	Acetato de chumbo	+	+
	Índice de espuma	+	+
Saponinas	Índice afrosimétrico	1.000	1.000

(+) reação positiva; (-) reação negativa

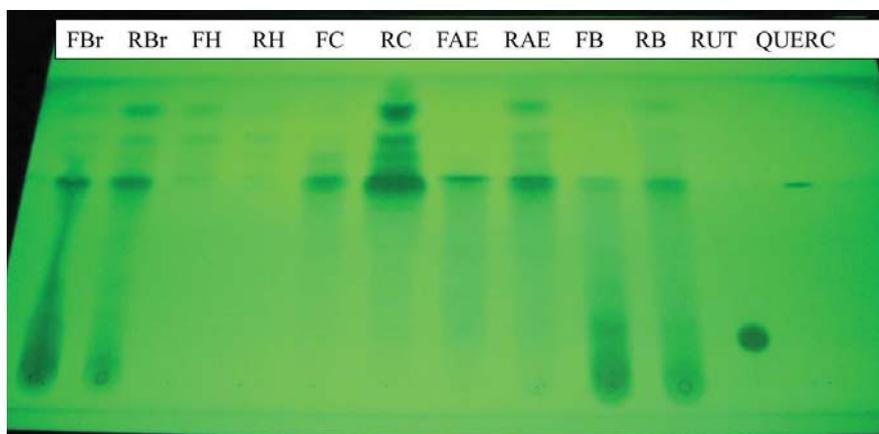


Figura 2 – Placa cromatográfica dos extratos brutos e semi-purificados de folhas e raízes de capim-annoni. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FAE: fração acetato de etila do extrato de folha; RAE: fração acetato de etila do extrato de raiz; FB: fração butanólica do extrato de folha; RB: fração butanólica do extrato de raiz; RUT: rutina (SQR); QUERC: quercetina (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10). Observação sob luz UV 254 nm. Passo Fundo, janeiro de 2013. Foto do autor.

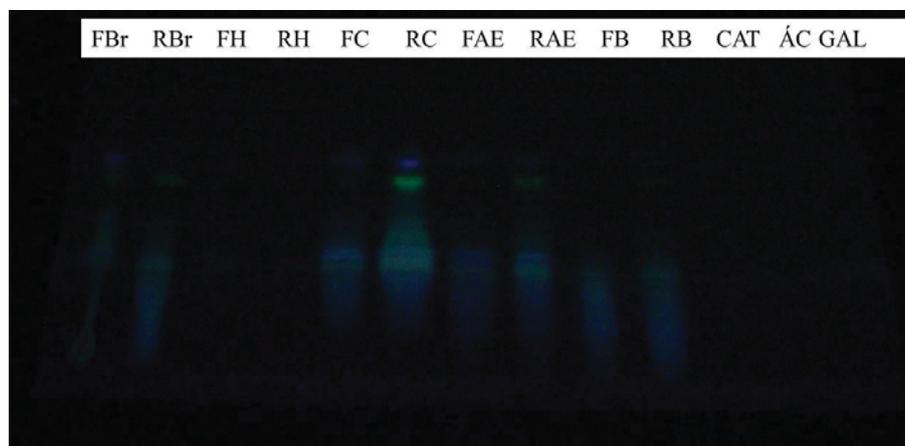


Figura 3 – Placa cromatográfica dos extratos brutos e semi-purificados de folhas e raízes de capim-annoni. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FAE: fração acetato de etila do extrato de folha; RAE: fração acetato de etila do extrato de raiz; FB: fração butanólica do extrato de folha; RB: fração butanólica do extrato de raiz; CAT: catequina (SQR); AC GAL: ácido gálico (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (20:40:10). Observação sob luz UV 365 nm. Passo Fundo, janeiro de 2013. Foto do autor.

A CCD realizada com o objetivo de verificar a presença de alcaloides (Figura 4) permitiu a visualização de manchas características de compostos nitrogenados em folhas e raízes de capim-annoni, mas em maior quantidade nas raízes. As manchas características puderam ser claramente detectadas nas frações hexano do extrato de raiz e folha e nas frações clorofórmio e acetato de etila apenas em raiz. Observando-se o perfil cromatográfico do extrato bruto também nota-se mais nitidamente a presença desses compostos no extrato da raiz.

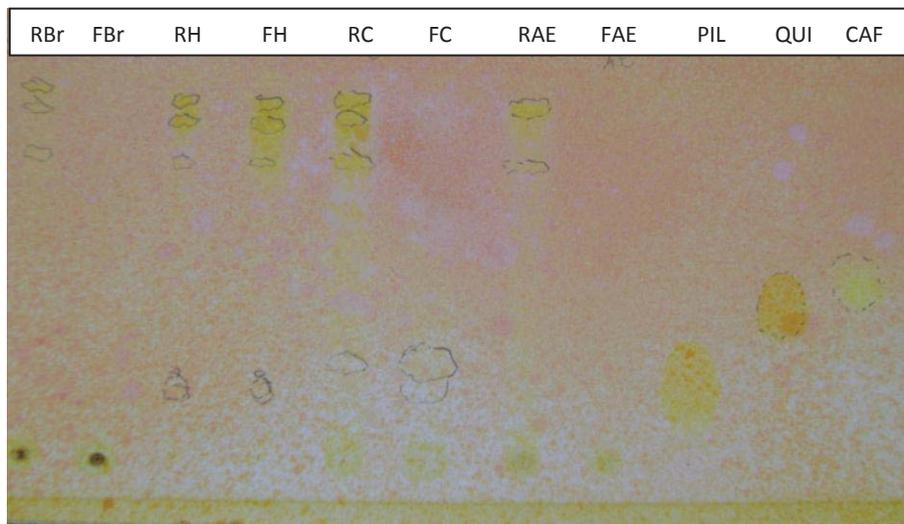


Figura 4 – Placa cromatográfica para detecção de alcaloides em capim-annoni. RBr: extrato bruto de raiz; FBr: extrato bruto de folha; RH: fração hexano do extrato de raiz; FH: fração hexano do extrato de folha; RC: fração clorofórmio do extrato de raiz; FC: fração clorofórmio do extrato de folha; RAE: fração acetato de etila do extrato de raiz; FAE: fração acetato de etila do extrato de folha; PIL: pilocarpina (SQR); QUI: quinina (SQR); CAF: cafeína (SQR). Fase móvel: tolueno:acetato de etila (95:5). Revelador: Reagente de Dragendorff. Passo Fundo, janeiro de 2013. Foto do autor.

Na placa revelada com vanilina sulfúrica, com o objetivo de detectar saponinas, utilizou-se uma fase móvel bem mais polar do que a utilizada para a detecção de alcaloides, sendo assim pode-se claramente visualizar que as folhas de capim-annoni apresentam maior concentração de compostos polares em relação à raiz (Figura 5).



Figura 5 – Placa cromatográfica para detecção de saponinas em capim-annoni. FBr: extrato bruto de folha; RBr: extrato bruto de raiz; URS: ácido ursólico (SQR). Fase móvel: acetona:tolueno:ácido fórmico (30:30:10). Revelador: vanilina sulfúrica. Passo Fundo, janeiro de 2013. Foto do autor.

3.1.2 Validação do método cromatográfico

A validação é uma ferramenta capaz de demonstrar, por meio de estudos experimentais, que o método é apropriado para a finalidade a que se destina, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os espectros obtidos em espectrofotômetro na faixa de 200 a 500 nm mostraram o máximo de absorção em 280 nm para os

ácidos fenólicos e 274 nm para cumarina. De acordo com isso, determinaram-se os comprimentos de onda a serem monitorados nos métodos cromatográficos.

O sistema de eluição que permitiu a melhor resolução dos picos referentes aos ácidos fenólicos, para os quais desenvolveu-se um sistema de detecção simultâneo, foi acetonitrila e água (pH 3,4) (25:75, v/v), com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 6). Para cumarina, a fase móvel mais adequada foi acetonitrila e água (pH 3,4) (55:45, v/v), com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 7). Nas condições otimizadas, o tempo de retenção de cada composto foi o seguinte: ácido cafeico (5,36 min) ácido ferúlico (5,73 min), ácido p-cumárico (8,21 min), ácido vanílico (7,61 min) e cumarina (4,59 min).

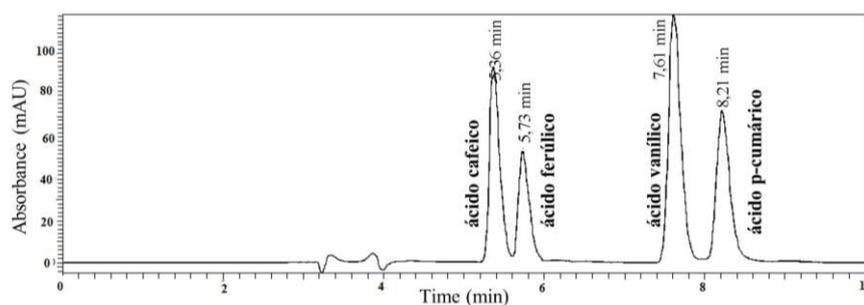


Figura 6 – Cromatograma obtido com as SQRs ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Passo Fundo, maio de 2013.

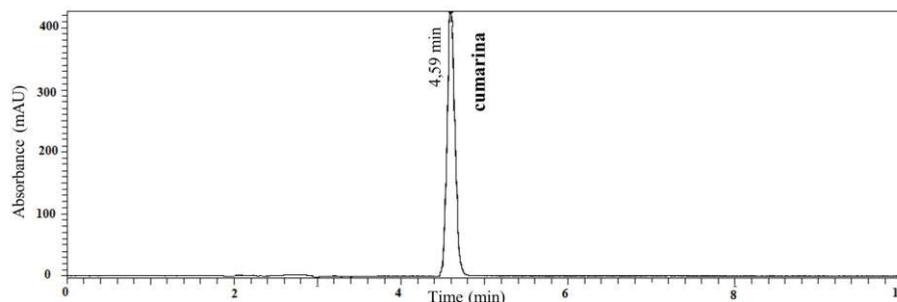


Figura 7 – Cromatograma obtido com a SQR cumarina na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Passo Fundo, maio de 2013.

Após a determinação das melhores condições cromatográficas, o método foi validado, a fim de atingir às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

3.1.2.1 Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de outros compostos com propriedades similares que possam estar presentes e garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN et al., 2001). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a precisão e a exatidão estarão seriamente comprometidas. Por isso, este parâmetro é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método (RIBANI et al., 2004).

Os resultados provenientes da avaliação da pureza do pico asseguraram a seletividade do método, considerando que todos os valores encontraram-se entre 1 e 1,5, conforme exigido pelo programa Chromera Flexar (Figura 8 e 9).

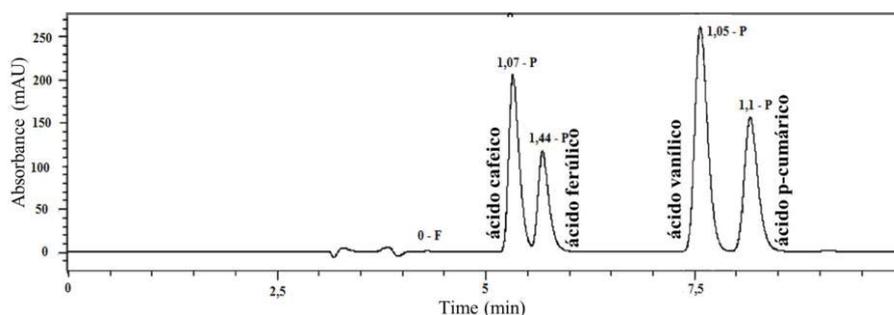


Figura 8 – Pureza dos picos das SQRs ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, verificada pelo detector de arranjo de diodos (PDA) e calculada pelo programa Chromera Flexar. Passo Fundo, maio de 2013.

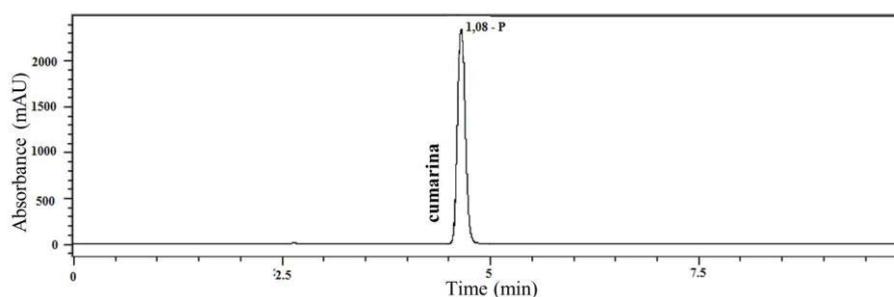


Figura 9 – Pureza do pico da SQR cumarina, verificada pelo detector de arranjo de diodos (PDA) e calculada pelo programa Chromera Flexar. Passo Fundo, maio de 2013.

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

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005). Usando o método de regressão linear, além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a

dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

A linearidade foi calculada para as soluções das SQRs no intervalo de 40-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As equações obtidas na regressão linear confirmaram a existência de uma relação linear entre as áreas e as concentrações pré-estabelecidas, com coeficiente de correlação superior a 0,99 (Tabela 4), atendendo as exigências da ANVISA e do ICH, que recomendam um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003; ICH, 2005), e do Inmetro, que exige um valor acima de 0,90 (INMETRO, 2003).

Tabela 4 - Equações lineares e coeficientes de correlação das SQRs

SQR	Equação linear	Coefficiente de correlação
ácido cafeico	$y = 53947x - 142669$	0,9998
ácido ferúlico	$y = 34188x - 19192$	0,9996
ácido p-cumárico	$y = 54331x - 210570$	0,9992
ácido vanílico	$y = 78391x - 11883$	0,9998
cumarina	$y = 76336x + 393699$	0,9981

Os limites de detecção e quantificação indicam a adequada sensibilidade dos métodos (Tabela 5). O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2003).

Tabela 5 - Limites de detecção e quantificação dos métodos para cada SQR

SQR	Limite de detecção	Limite de quantificação
		($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
ácido cafeico	2,96	8,97
ácido ferúlico	6,82	20,67
ácido p-cumárico	1,92	5,8
ácido vanílico	0,49	1,47
cumarina	6,47	19,60

3.1.2.3 Exatidão e precisão

A precisão do método significa que ele apresenta concordância, ou seja, pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma amostra. A exatidão representa o 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 6) mostrou valores com percentual de recuperação adequado para o estudo (próximos a 100%). Da mesma forma, a precisão intra-dia apresentou valores de desvio padrão relativo dentro do critério de aceitação de até 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005) (Tabela 7). Portanto, as metodologias desenvolvidas caracterizam-se como exatas e precisas.

Tabela 6 - Exatidão das SQRs

SQR	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão* (%)
ácido cafeico	100	102,88	102,88
	140	146,28	104,49
	180	184,57	102,54
ácido ferúlico	100	103,45	103,45
	140	147,07	105,05
	180	185,86	103,26
ácido p-cumárico	100	101,27	101,27
	140	143,43	102,45
	180	181,87	101,04
ácido vanílico	100	103,41	103,41
	140	147,44	105,31
	180	186,36	103,53
cumarina	100	104,41	104,41
	140	150,43	107,45
	180	188,0	104,99

*expressa em % de recuperação

Tabela 7 - Precisão intra-dia das SQRs

SQR	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D.P.R* (%)
ácido cafeico	200,00	199,82	0,91
ácido ferúlico	200,00	204,57	1,06
ácido p-cumárico	200,00	200,27	1,03
ácido vanílico	200,00	201,00	1,88
cumarina	200,00	197,03	0,38

* Desvio padrão relativo

3.1.2.4 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método é considerado robusto se não alterar sua resposta quando submetido a pequenas modificações em seus parâmetros (INMETRO, 2003). As pequenas

modificações propostas nas condições cromatográficas de pH e fluxo da fase móvel não alteraram a resposta do método e as concentrações das SQRs. Os valores de percentual de recuperação foram adequados para o estudo (ICH, 2005), demonstrando a robustez do método (Tabela 8).

Tabela 8 – Condições cromatográficas e faixas investigadas durante o teste de robustez para as SQR

		SQR (% de recuperação)				Cumarina
		ácido cafeico	ácido ferúlico	ácido p-cumárico	ácido vanílico	
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,98	88,7	90,2	89,5	92,2	100,1
	1,02	90,5	90,1	91,7	89,9	96,4
pH da fase móvel	3,37	100,0	90,9	102,7	101,3	99,0
	3,43	100,4	90,2	101,5	91,8	99,1

3.1.3 Análise fitoquímica por CLAE

A análise por CLAE permitiu identificar a presença dos ácidos cafeico, ferúlico, vanílico e p-cumárico tanto em folhas quanto em raízes de capim-annoni (Figura 10). Excetuando o ácido ferúlico, que teve maior concentração em raiz, os demais mostraram-se em maior quantidade na folha (Tabela 9). Os cromatogramas obtidos com os extratos indicam também a presença de dois picos majoritários com característica bem polar, tanto em folhas quanto em raízes de capim-annoni, com tempos de retenção de 2,18 e 3,37 minutos (Figura 10). Estes picos estão em maior magnitude na folha, apontando uma maior quantidade de compostos polares neste órgão quando comparada a raiz.

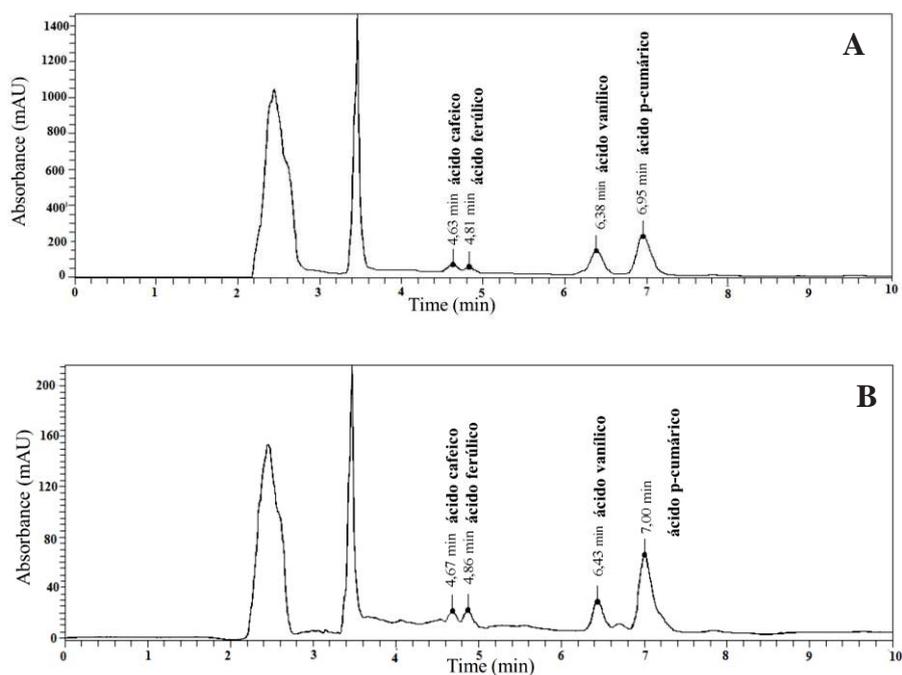


Figura 10 – Perfil cromatográfico de folhas (A) e raízes (B) de capim-annoni para detecção de ácidos fenólicos. Passo Fundo, maio de 2013.

A cumarina foi detectada em folhas e raízes do capim-annoni (Figura 11), estando em igual concentração em ambos os órgãos (Tabela 9). A catequina e a epicatequina foram observadas apenas em folhas de capim-annoni (Figura 12 e Tabela 9). Por meio da CLAE, não foi observada a presença dos alcaloides gramina e hordenina, dos flavonóis rutina, canferol, quercetina e do ácido gálico nos extratos testados.

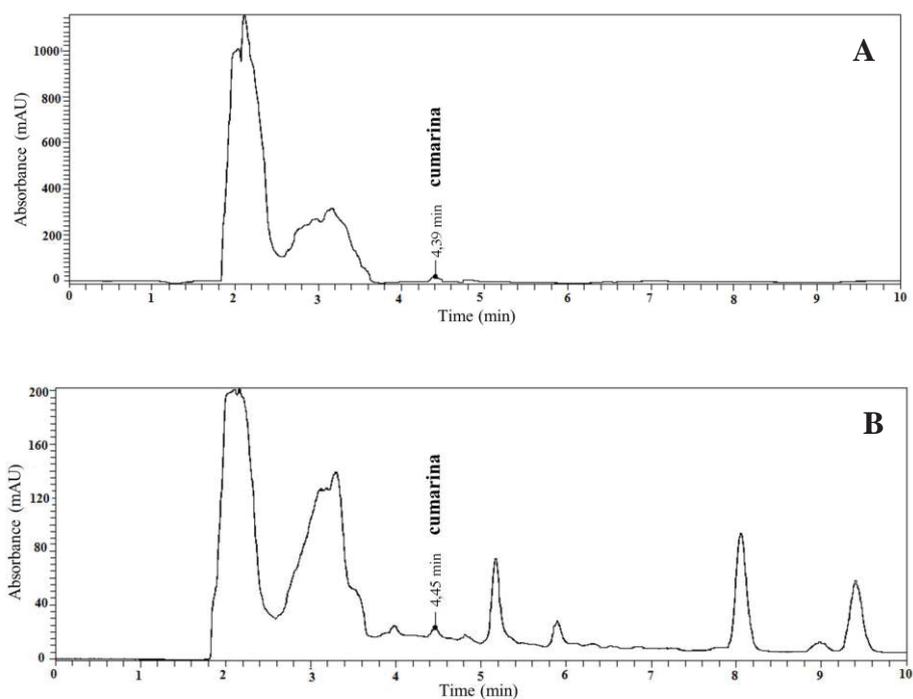


Figura 11 – Perfil cromatográfico de folhas (A) e raízes (B) de capim-annoni para detecção de cumarina. Passo Fundo, maio de 2013.

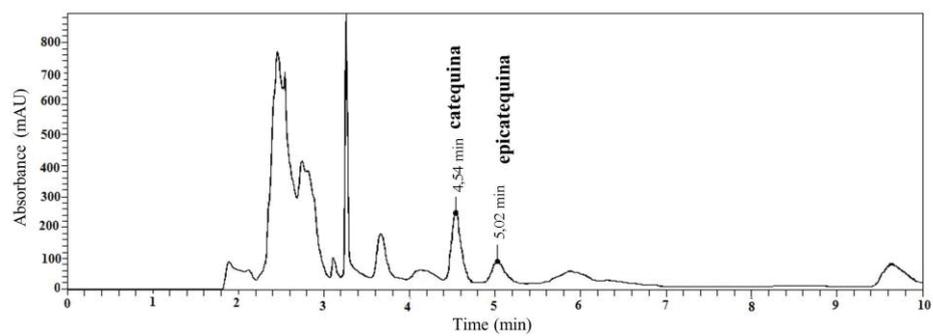


Figura 12 – Perfil cromatográfico de folhas de capim-annoni para detecção de catequina e epicatequina. Passo Fundo, maio de 2013.

Tabela 9 – Concentração dos compostos encontrados em folhas e raízes de capim-annoni

SQR	Folha	Raiz
	-----mg g ⁻¹ MS-----	
ácido caféico	0,19 A	0,07 B
ácido ferúlico	0,06 B	0,18 A
ácido p-cumárico	0,94 A	0,34 B
ácido vanílico	0,42 A	0,05 B
Catequina	9,56 A	0,00 B
Epicatequina	4,22 A	0,00 B
cumarina	0,09 A	0,09 A

Médias seguidas por letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2 Discussão

O resultado positivo para alcaloides nos testes gerais e CCD e o resultado negativo por meio da CLAE se explica pelo fato de que os dois primeiros testes consideram a classe dos alcaloides, enquanto que na CLAE foram testadas apenas duas substâncias químicas isoladas pertencentes a este grande grupo. Embora os dois alcaloides testados são os aleloquímicos mais comumente encontrados nas gramíneas, não estão presentes no capim-annoni, sugerindo a presença de outros alcaloides nesta espécie e a necessidade de identificar essas substâncias e sua relação com a alelopatia da planta.

A presença de flavonoides, verificada pelos testes gerais de identificação, não pode ser visualizada claramente através da CCD, provavelmente devido a presença simultânea de muitos outros compostos nos extratos. O que pode ser afirmado é que o capim-annoni não possui os flavonoides rutina, canferol e quercetina, já que estes compostos não foram detectados através da CLAE.

Os taninos foram identificados pelos testes gerais e, por meio da CLAE, observou-se a presença de monômeros de taninos catequina e epicatequina em folhas de capim-annoni. Na CCD, visualizou-se a presença de compostos fenólicos, o que pode indicar a presença de taninos.

Os resultados positivos para saponinas, tanto nos testes gerais quanto na CCD, indicam que este grupo merece ser melhor investigado no capim-annoni, inclusive por CLAE, tendo em vista que as saponinas são aleloquímicos que atuam na redução da atividade respiratória devido à baixa difusão de oxigênio através do tegumento, inibindo a germinação e o crescimento das plantas (MARASCHIN-SILVA & AQÜILA, 2005).

Dentre os grupos químicos identificados neste estudo, os ácidos fenólicos são os aleloquímicos mais comuns nas plantas (LI et al., 2010) e os mais importantes compostos em invasoras (EL-KHATIB et al., 2004). Ácidos fenólicos já foram responsabilizados pelo potencial alelopático de outras gramíneas, como *Brachiaria mutica* (Forssk.) Stapf. (CHOU, 1989), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (GUENZI & MCCALLA, 1966), arroz (*Oriza sativa* L.) (CHOU, 1989); *B. humidicola* (Rendle) Scheick. (ALVES & SOUZA FILHO, 2002) e Kikuiu (*Pennisetum clandestinum* Hochst) (CHOU, 1989).

Os ácidos fenólicos, principalmente o ácido p-cumárico, inibem a germinação e crescimento das plantas (ALVES & SOUZA FILHO, 2002). Esses compostos diminuem a permeabilidade da membrana, inibem a absorção de nutrientes, o alongamento da raiz, divisão celular, mudanças celulares ultra-estruturais e o metabolismo de lipídios (BALERONI et al., 2000), reduzem o conteúdo de clorofila

e taxa fotossintética (LI et al., 2010) e alteram o nível do ácido indolacético (AIA) (ENHELIG, 1986). Os ácidos ferúlico e p-cumárico aumentam o nível de peróxido de hidrogênio e a atividade da peroxidase (POLITYCKA et al., 2004).

A quantidade de ácido ferúlico encontrada nas raízes de capim-annoni ($0,18 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) é semelhante a quantidade do mesmo composto ($0,1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) em mostarda-preta (*Brassica nigra* L.), que causou efeito inibitório na germinação e crescimento das plantas conforme descrito por Al-Sherif et al. (2013). Estes mesmos autores descreveram que uma quantidade de $0,06 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ de ácido cafeico e $0,02 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ de ácido p-cumárico foram necessárias para inibir a germinação e o crescimento de plântulas, quantidades estas menores do que as encontradas em folhas e raízes do capim-annoni (Tabela 9), sugerindo assim que as quantidades desses ácidos nos extratos de capim-annoni estariam em concentrações suficientes para causar efeito alelopático.

As cumarinas inibem a germinação de sementes (RICE, 1984), o crescimento de raiz e parte aérea (HIERRO & CALLAWAY, 2003), a fosforilação oxidativa (RAZAVI, 2011) e tem efeito na síntese de ATP (MATA et al., 1998). Além disso, limitam a produção de pelos radiciais, o que, conseqüentemente muda a condição hídrica da planta, afetando a área foliar e a abertura e fechamento dos estômatos (KRUSE et al., 2000; COLPAS et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Em extratos de araticum (*Annona glabra* L.), a concentração de $0,039 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ de cumarina inibiu o comprimento do coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L.) (MATSUMOTO et al., 2010). Como a concentração de cumarina descrita em araticum é

menor que a encontrada neste trabalho ($0,09 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), sugere-se que a quantidade desta substância no capim-annoni poderia contribuir com o potencial alelopático da planta.

A catequina inibe a germinação de sementes, mas em maior magnitude prejudica o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, enquanto que a epicatequina inibe mais a germinação das plantas do que o desenvolvimento (LÔBO et al., 2008). Além de inibir a germinação e o crescimento, a catequina estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (BAIS et al., 2003). Lôbo et al. (2008) demonstram que uma quantidade de 5 mg de catequina e epicatequina foi suficiente para causar efeito alelopático. Neste trabalho uma concentração próxima a esta foi encontrada em folhas de capim-annoni para catequina ($4,22 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e uma concentração maior de epicatequina ($9,56 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (Tabela 9), sugerindo que estas substâncias também podem contribuir com o potencial alelopático da planta.

Os resultados encontrados neste trabalho são úteis para o entendimento da diferente atividade alelopática entre folhas e raízes de capim-annoni. Excetuando a concentração de ácido ferúlico, que foi maior em raiz do que em folha, e a cumarina, que foi igual para os dois órgãos, os demais compostos estão em maior quantidade ou estão presentes somente nas folhas do capim-annoni. Portanto, o maior efeito alelopático das folhas (FAVARETTO et al., 2011) seria justificado pela presença e quantidade destes compostos. De acordo com Reinhardt & Bezuidenhout (2001), folhas parecem ser as mais consistentes fontes de químicos envolvidos na fitotoxicidade, enquanto poucas e menos potentes toxinas ocorrem nas raízes. A

maior quantidade de ácidos fenólicos na folha, evidenciado pela CLAE, além do perfil cromatográfico demonstrado nas CCDs e CLAE, indicam que a folha possui maior quantidade de compostos polares, enquanto a raiz tem maior quantidade de compostos apolares. Há evidências de que extratos de caráter mais polar são mais eficazes na inibição da germinação e crescimento das plantas, ou seja, são mais alelopáticos (BELINENO et al., 2008; SANTOS et al., 2011). Portanto, o caráter mais polar da folha de capim-annoni poderia explicar sua maior atividade alelopática comparada com a da raiz.

Todos os aleloquímicos identificados neste trabalho possuem efeito na germinação e crescimento das plantas. Os extratos de capim-annoni utilizados nos trabalhos de alelopatia afetaram justamente estes dois parâmetros (FAVARETTO et al., 2011; FERREIRA et al., 2008), por isso supõe-se que os aleloquímicos aqui identificados são responsáveis ou contribuem para o efeito alelopático da planta. A fim de comprovar isto, se torna necessário testar a atividade alelopática dos compostos isolados da planta e ainda, prosseguir com as investigações fitoquímicas a fim de isolar e identificar novos compostos, considerando que os cromatogramas apresentaram picos majoritários desconhecidos.

4 CONCLUSÕES

Testes gerais de identificação e CCD em capim-annoni indicam a presença de compostos pertencentes à classe dos alcaloides, saponinas e flavonoides em folhas e raízes de capim-annoni e taninos somente em folhas.

O método analítico proposto para a determinação dos ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, vanílico e da cumarina por CLAE é seletivo, linear, exato, preciso e robusto.

A CLAE evidencia a presença dos ácidos cafeico, ferúlico, vanílico e p-cumárico, cumarina, catequina e epicatequina em concentrações variáveis de acordo com o órgão da planta. Tais compostos podem estar relacionados com a atividade alelopática dessa gramínea.

A maior concentração de compostos e a presença de compostos mais polares na folha podem explicar o maior efeito alelopático deste órgão da planta.

CAPÍTULO III

CARACTERES ANATÔMICOS E HISTOQUÍMICOS DE CAPIM-ANNONI (*Eragrostis plana* Nees)

Adriana Favaretto¹

RESUMO – Este estudo constitui o primeiro relato de caracteres anatômicos e histoquímicos do capim-annoni, a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil. Folhas e raízes foram coletadas, fixadas em FAA 70, seccionadas, coradas e fotografadas em microscópio óptico. Cortes manuais foram realizados a partir do material fresco e submetidos a reagentes específicos para determinar lipídios, fenóis, taninos, lignina, alcaloides e amido. As folhas são anfiestomáticas, com estômatos paracíticos, epiderme com células lignificadas, estrutura Kranz, feixes vasculares colaterais de dois tamanhos e tricomas tectores, unisseriados, cristalinos e em forma de agulha. A raiz é poliarca e apresenta lacunas de ar no parênquima cortical, formando aerênquima. A endoderme possui espessamento em forma de “U” e a medula parenquimática tem células com plastídios armazenadores de amido. Folhas e raízes apresentam lipídios, fenóis, lignina e alcaloides; amido foi observado somente na raiz. Caracteres anatômicos e histoquímicos do capim-annoni sugerem características adaptativas que podem explicar sua persistência sob estresses bióticos e abióticos.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia (ppgAGRO) da FAMV/UPF, área de concentração em Produção Vegetal.

Palavras-chave: aerênquima, amido, invasora.

**ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL TRAITS OF TOUGH
LOVEGRASS (*Eragrostis plana* Nees)**

ABSTRACT - This paper constitutes the first report of histochemical and anatomical traits of tough lovegrass, the main invasive plant of the natural pastures of the Southern Brazil. Leaf blades and roots were collected, fixed in FAA 70, sectioned, stained and photographed in light microscope. Manual cuts were performed from the fresh material and subjected to specific reagents to determine lipids, phenols, tannins, lignin, alkaloids and starch. The leaves are amphistomatic, with paracytic stomata, epidermis with lignified cells, Kranz structure, collateral vascular bundles of two sizes, and non-glandular, uniseriate, crystalline and needle-shaped trichomes. The roots are polyarc, with air gaps on the cortical parenchyma, forming the aerenchyma; the endoderm has “U” shaped thickening and pith parenchymatic has cells with starch storage plastids. Leaves and roots present lipids, phenols, lignin and alkaloids; starch was observed only in the root. Anatomical and histochemical traits of the tough lovegrass suggest adaptive features that can explain its persistence under biotic and abiotic stress.

Key-words: aerenchyma, invasive, starch.

1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil, especialmente aquelas sujeitas à elevada pressão de pastejo, pois tolera solos compactados e pisoteio. Além disso, possui sistema radicial ramificado e profundo, o que dificulta ainda mais sua erradicação (MEDEIROS & FOCHT, 2007). Esses atributos explicam a elevada contaminação ambiental dessa espécie nas pastagens naturais, o que ameaça toda a biodiversidade dos campos sulinos.

O efeito alelopático do capim-annoni (FAVARETTO et al., 2011) é um dos fatores que contribui para sua expansão, pois afeta negativamente o crescimento das demais espécies. Compostos do metabolismo secundário como taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas são os mais comumente encontrados em plantas alelopáticas (KING & AMBIKA, 2002). Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários são inesgotáveis, sendo que apenas cerca de 15% das espécies foram estudadas quanto ao perfil fitoquímico (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). O capim-annoni encontra-se entre as 85% de espécies ainda não estudadas.

Caracteres anatômicos, os quais podem estar relacionados com a adaptação do capim-annoni às condições adversas de clima e solo, também não são conhecidos. A elucidação de aspectos referentes à anatomia é fundamental para subsidiar pesquisas aplicadas ao controle dessa invasora. Enquanto que a abordagem fitoquímica,

embora rara em pesquisa de alelopatia, pode ser útil para localizar e identificar os aleloquímicos presentes na planta. Este estudo analisou anatômica e histoquimicamente folhas e raízes do capim-annoni, a fim de subsidiar estudos ecofisiológicos e químicos dessa importante invasora.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Folhas e raízes foram coletadas de plantas de uma população espontânea de capim-annoni, presentes numa área de 100 m², localizada em Passo Fundo, RS, em outubro de 2012. Uma exsicata dessa população foi depositada no herbário da UPF (RSPF) sob número 11832. O solo da área apresentou os seguintes atributos: teor de argila: 40,7%; pH em água: 5,3; P: 6,6 mg.dm⁻³; K: 164 mg.dm⁻³; matéria orgânica: 3,7%; Al: 0,3 cmol_c.dm⁻³; Ca: 4,2 cmol_c.dm⁻³; Mg: 1,9 cmol_c.dm⁻³; CTC: 15,2 cmol_c.dm⁻³; saturação de bases: 43%; saturação de Al: 4%; saturação de K: 2,8%. S: 10,0 mg.dm⁻³; Mn: 30,9 mg.dm⁻³; Bo: 0,5 mg.dm⁻³; Zn: 1,20 mg.dm⁻³; Cu: 2,1 mg.dm⁻³. O clima da região é subtropical do tipo Cfa, com temperatura média anual de 18,4 °C.

Para análise anatômica, foram coletadas, aleatoriamente, cinco plantas adultas, em estágio vegetativo e com tamanho similar. Estas plantas foram separadas em parte aérea e raiz e, então, fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 70° GL; 5:5:90, v/v) por 48 horas, com posterior armazenamento em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Foram retiradas de cada planta a última folha totalmente expandida e a raiz mais longa. Dessas partes foram realizados, manualmente, cortes transversais da sua porção mediana, seguido de submersão por aproximadamente cinco minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial diluído a 20%. O material foi corado com fucsina básica e azul de alcian para evidenciar paredes lignificadas e celulósicas, respectivamente. As lâminas foram

montadas em glicerina 50% e analisadas em microscópio óptico Olympus CX31.

Para a análise histoquímica, foram realizados cortes manuais do material fresco utilizando a porção mediana da última folha totalmente expandida e da raiz mais longa de cinco de plantas de capim-annoni. Os cortes foram submetidos a reagentes específicos para determinar os grupos químicos: Sudan III foi utilizado para lipídios totais, cloreto férrico para fenóis, vanilina 5% para taninos, floroglucina para lignina, reagente de Dragendorff para alcaloides e lugol para amido (ASCENSÃO, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise anatômica

A lâmina foliar do capim-annoni possui epiderme unisseriada, cujas células apresentam paredes periclinais externas espessadas e lignificadas (Figura 1). O espessamento e lignificação limitam a digestão da parede celular (AKIN, 1989) e esta é uma das razões da baixa qualidade nutricional e rejeição do capim-annoni pelos animais (ZENNI & ZILLER, 2011), o que contribui para sua persistência nas pastagens. Além disso, a lignificação das células epidérmicas, por proporcionar rigidez e impermeabilidade, tem influência nas propriedades tensoras da folha que, por sua vez, tem correlação com as relações hídricas, tolerância à seca e injúrias mecânicas (BALSAMO & ORKWISZEWSKI, 2008).

O capim-annoni tem folhas rígidas e que se dobram ao meio, junto à nervura central. Essa característica é uma adaptação da tribo Eragrostideae a condições estressantes, porque a folha, ao se dobrar ou se enrolar, mantém a epiderme abaxial exposta, ao passo que a epiderme adaxial protege internamente os estômatos, reduzindo a transpiração excessiva (RENVOIZE, 1983). Comparando espécies de *Eragrostis* spp., as quais apresentam distinta tolerância à deficiência hídrica, *E. curvula* (tolerante), *E. tef* (Zucc.) Trotter (moderadamente tolerante) e *E. capensis* (Thunb.) Trin. (não tolerante), Balsamo et al. (2006) sugeriram uma positiva correlação entre a arquitetura interna da folha, tensão e propriedades químicas da parede celular com a tolerância à desidratação.

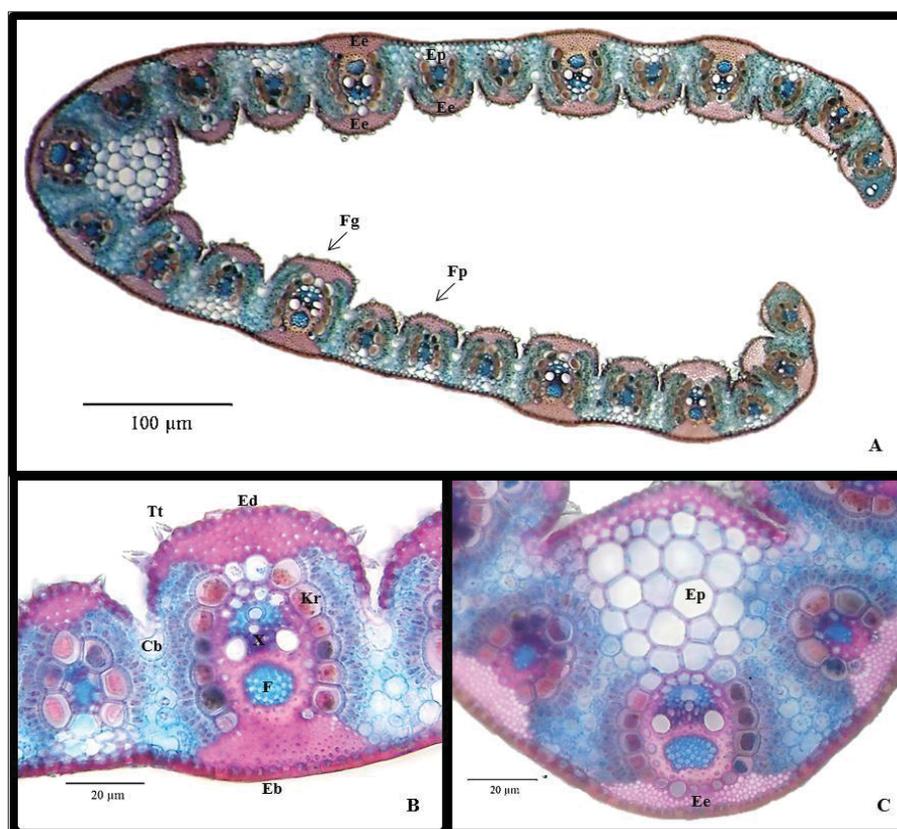


Figura 1 - Secção transversal da folha de capim-annoni. A: folha inteira. B: feixe vascular evidenciando estrutura Kranz. C: quilha. Cb = células buliformes; Eb = epiderme abaxial; Ed = epiderme adaxial; Ee = extensão esclerenquimática; Ep = extensão parenquimática; F = floema; Fg = feixes vasculares de tamanho grande; Fp = feixes vasculares de tamanho pequeno; Kr = estrutura Kranz; Tt = tricomas tectores; X = xilema. Passo Fundo, janeiro de 2013. Fotos do autor.

As folhas do capim-annoni são anfiestomáticas, com ocorrência de estômatos paracíticos, como foi verificado em *E. tremula* (S.W. Beauv) (OGIE-ODIA et al., 2010). Nas gramíneas é comum a presença de estômatos em ambas as faces da lâmina foliar, geralmente em duas fileiras na face abaxial e adaxial, sendo alternados com as células interestomatais na face abaxial. A face adaxial da folha apresenta sulcos ao longo de sua extensão (Figura 1A), onde se

localizam as células buliformes ladeadas pelos estômatos (Figura 1B). Sanchez & Koch (1998), ao analisarem quarenta espécies de *Eragrostis* no México, observaram distintos padrões quanto a este atributo. Estas células são responsáveis pelo enrolamento da folha e em condições desfavoráveis de suprimento hídrico reduzem a área de transpiração. Em *E. capensis*, espécie não tolerante à deficiência hídrica, as células buliformes se encontram em vários estratos espessos e são um dos maiores componentes da lâmina foliar, em relação às espécies mais tolerantes à seca (*E. curvula* e *E. tef*) (BALSAMO et al., 2006). A presença de profundas cavidades na face adaxial, e às vezes na face abaxial, com estômatos, microtricomos, papilas e tricomas pontiagudos foi relatada por Renvoize (1983) para Eragrostidaeae. Os tricomas do capim-annoni (Figura 1B) são tectores, unisseriados, cristalinos e em forma de agulha, confirmando as características descritas para a tribo. No entanto, a localização destes tricomas é na face adaxial das folhas de capim-annoni, ao contrário do que é relatado por Ingram (2010) para o gênero *Eragrostis*. A presença dos tricomas pode ser interpretada como proteção dos estômatos, e até mesmo do mesófilo, contra o excesso de calor e, ainda, no isolamento e reflexão da luz (FAHN, 1990).

No mesófilo, que é composto por parênquima clorofiliano, as células são dispostas radialmente em torno dos feixes (anatomia Kranz), com endoderme interna (bainha do feixe) (Figura 1B). Todas as espécies de *Eragrostis* exibem anatomia Kranz, exceto *E. walteri* Pilg., da África do Sul, que possui anatomia C3 (ELLIS, 1984). A presença de anatomia Kranz nas plantas contribui para o menor consumo pelos animais, pois a digestão da bainha do feixe vascular é

lenta ou incompleta, devido à sua parede celular espessada. Isto dificulta o acesso dos microrganismos ruminais aos nutrientes no interior das células, que contém mais de 50% das reservas de carboidratos e proteínas da folha (WILSON, 1994).

Os feixes vasculares do capim-annoni são do tipo colateral e apresentam-se de dois tamanhos distintos: grandes e pequenos (Figura 1A). Nas gramíneas tropicais, a epiderme encontra-se firmemente aderida ao resto da folha por uma estrutura em forma de viga, formada por porções do esclerênquima, pela bainha do feixe vascular e pelo próprio feixe vascular. Essa estrutura pode ser classificada como viga em forma de “I” ou em forma de “T” (WILSON, 1994). No capim-annoni, os feixes grandes e os dois últimos feixes de cada lado da asa possuem viga em forma de “I”, ou seja, tem extensão esclerenquimática da bainha tanto para a face abaxial quanto para a adaxial, enquanto que os feixes pequenos possuem viga em forma de “T”, ou seja, extensão esclerenquimática da bainha apenas para a face adaxial (Figura 1A). A estrutura de viga em forma de “T” foi verificada por Ingram (2010) em outras espécies de *Eragrostis*, como *E. dielsii* Pilg., *E. japonica* (Thunb.) Trin. e *E. sessilispica* Buckl. e foi utilizada como um dos critérios para diferenciá-las taxonomicamente das demais espécies do gênero. A estrutura de viga dificulta o desprendimento da epiderme do restante da folha, resultando em maior resistência da planta aos danos mecânicos, químicos e à digestão pelos ruminantes, devido ao espessamento e lignificação das células epidérmicas (PACIULLO, 2002), além da diminuição dos espaços na lamela média. A resistência à digestão é maior em espécies que apresentam viga em forma de “I”,

relativamente àquelas que apresentam viga em forma de “T” (WILSON, 1994). As vigas de esclerênquima na tribo Eragrostideae são modificações foliares com vistas à adaptação a extremos climáticos (RENVOIZE, 1983). Na quilha observou-se de 3 a 12 feixes vasculares. Somente o feixe central possui extensão de células parenquimáticas na face adaxial e os demais possuem extensão esclerenquimática da bainha na face abaxial (Figura 1C).

A raiz é poliarca (Figura 2A), com epiderme unisseriada e exoderme lignificada (Figura 2B). O parênquima cortical possui grandes lacunas de ar, formando o aerênquima (Figura 2B). A endoderme tem espessamento em “U” (Figura 2C). A medula parenquimática possui células com plastídios armazenadores de amido (Figura 2D), característica que não é comum nas demais espécies da família Poaceae. Desta forma, a estrutura anatômica da raiz do capim-annoni, com presença de aerênquima e reservas de amido, pode ser um dos caracteres que confere a excelente adaptação a solos pobres, compactados, bem como tolerância à geada e resistência à herbivoria. O capim-vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), que possui sistema radicial similar ao do capim-annoni, com aerênquima e medula armazenadora de amido (DELISTOIANOV & TOLEDO, 1960), é uma espécie capaz de suportar extremos climáticos: secas, longos períodos de inundação, temperaturas de -10 a 48 °C, acidez do solo e alcalinidade (MICKOVSKI & VAN BEEK, 2009).

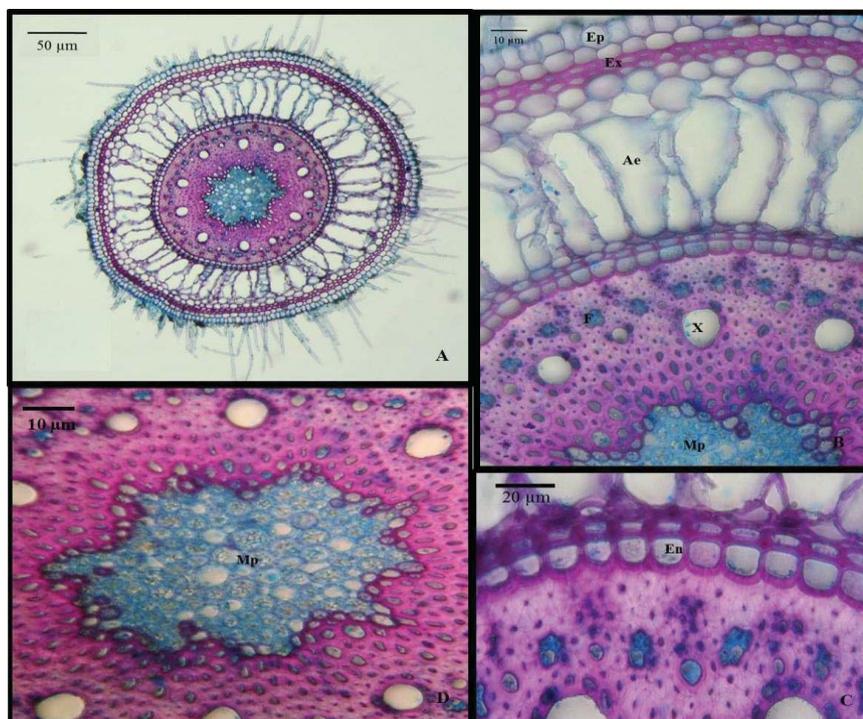


Figura 2 - Secção transversal da raiz de capim-annoni. A: raiz inteira. B: detalhe do aerênquima; En = endoderme; Ep = epiderme; Ex = exoderme; F = floema; Mp = medula parenquimática; X = xilema. Passo Fundo, janeiro de 2013. Fotos do autor.

3.2 Análise histoquímica

A reação para detecção de lipídios totais evidenciou a presença desses compostos na cutícula das folhas (Figura 3A). Na raiz, lipídios foram verificados na exoderme e na endoderme (Figura 4A). Dos compostos fenólicos avaliados, a reação foi positiva em folha e raiz para fenóis e lignina e negativa para taninos (Tabela 1). Na folha, fenóis foram observados nas células da bainha e do parênquima paliçádico, enquanto que a lignina foi detectada nas fibras que envolvem os feixes vasculares e nos elementos de vaso (Figura

3C e 3D). Na raiz houve ocorrência de fenóis nos espaços intercelulares da medula e de lignina junto aos feixes vasculares (Figura 4B).

Tabela 1 - Histoquímica de folhas e raízes de capim-annoni

Grupo metabólico		Órgão	Resultado
Lipídios	Lipídios totais	Folha	+
		Raiz	+
Compostos fenólicos	Fenóis	Folha	+
		Raiz	+
	Taninos	Folha	-
		Raiz	-
	Lignina	Folha	+
		Raiz	+
Alcaloides		Folha	+
		Raiz	+
Glicídios	Amido	Folha	-
		Raiz	+

+ (presença); - (ausência).

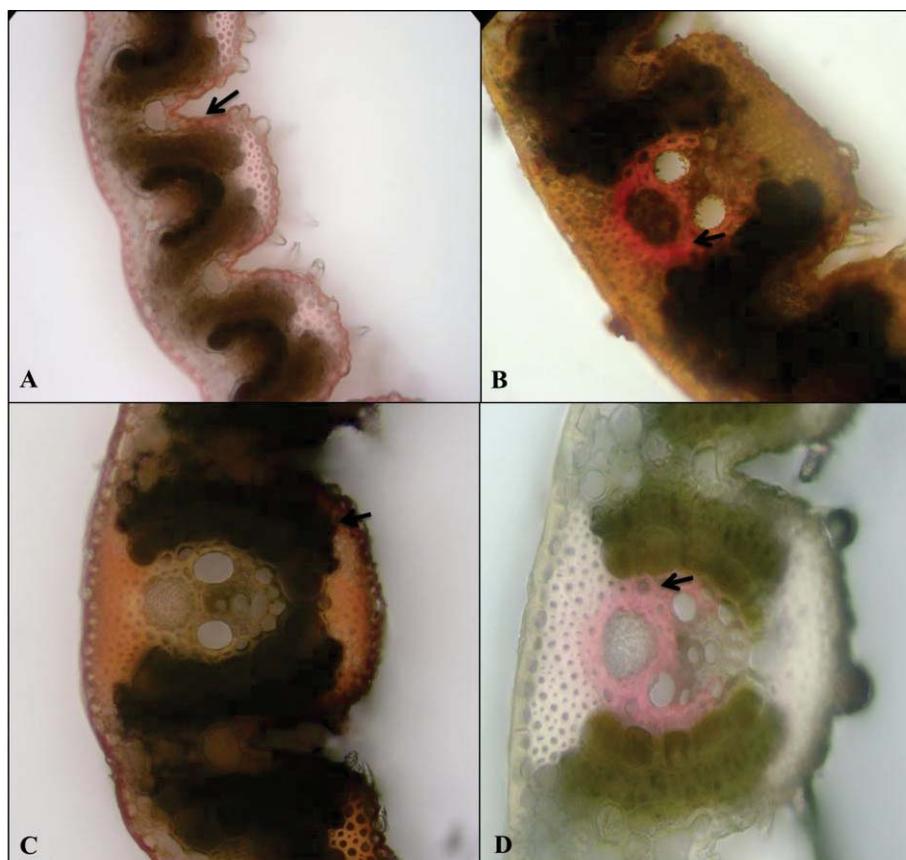


Figura 3 – Testes histoquímicos em folhas de capim-annoni. A: detecção de lipídios. B: detecção de alcaloides. C: detecção de fenóis. D: detecção de lignina. Passo Fundo, janeiro de 2013. Fotos do autor.

Os compostos fenólicos estão relacionados à proteção da planta quanto ao dessecamento e à herbivoria (DANIEL et al., 1999). Os fenóis atuam na proteção das estruturas celulares contra o excesso de radiação ultravioleta e na manutenção da integridade do protoplasto em situações de estresse hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2013). A lignina, que é um composto fenólico, é considerada substância resistente aos patógenos e ainda reduz a digestibilidade da matéria seca (SILVA et al., 2005).

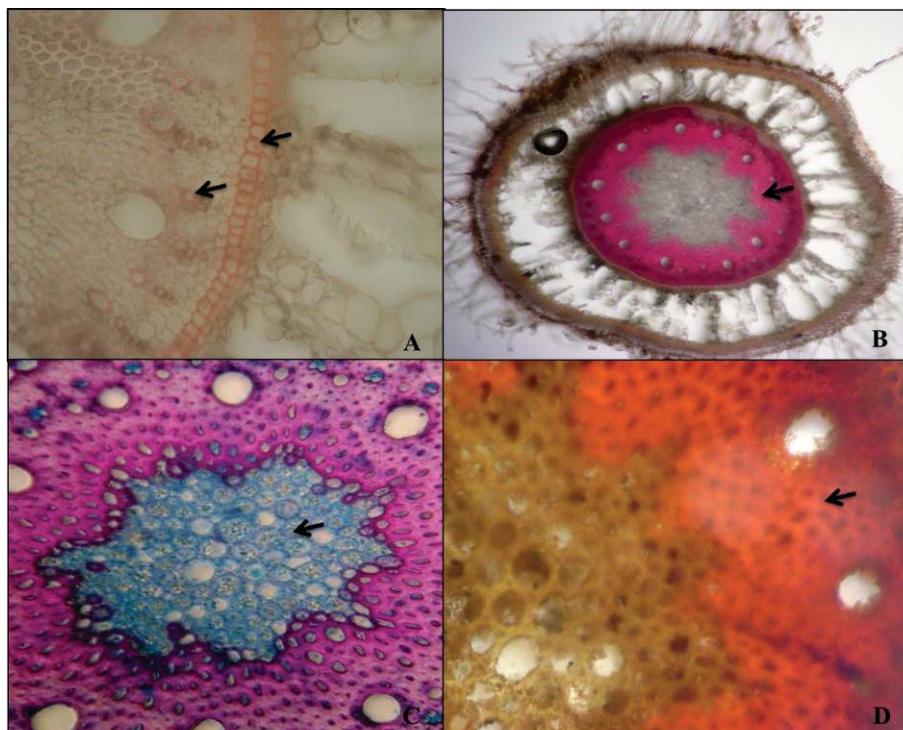


Figura 4 – Testes histoquímicos em raízes de capim-annoni. A: detecção de lipídios. B: detecção de lignina. C: detecção de amido. D: detecção de alcaloides. Passo Fundo, janeiro de 2013. Fotos do autor.

A reação para detecção de alcaloides foi positiva na folha e na raiz (Tabela 1), evidenciando a presença destes compostos junto aos feixes vasculares de ambos os órgãos (Figuras 3B e 4D). Em *E. tremula* P. Beauv, a presença de alcaloides também foi verificada (OGIE-ODIA et al., 2010). Muitos alcaloides tem função de defesa contra herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 2013), além de possuir potencial alelopático (KING & AMBIKA, 2002).

A reação para detecção de amido na folha foi negativa. No entanto, na raiz, o teste com lugol detectou esse carboidrato na região da medula (Figura 4C), o que também foi observado na análise anatômica. Nos amiloplastos de tecidos não-fotossintetizantes, como

as raízes, o amido é acumulado por períodos prolongados e mobilizado quando necessário para o crescimento (ONG et al., 1994). Carboidratos de reserva são usados para suportar a respiração e crescimento quando a área foliar e a fotossíntese diminuem após um corte, e são convertidos em sacarose e translocados para áreas meristemáticas em crescimento (NELSON, 1995).

Com exceção desse carboidrato, para o qual houve ausência em folha e presença em raiz, não houve diferença entre tais órgãos quanto aos grupos químicos detectados pela análise histoquímica. No entanto, pesquisas indicaram que extratos de folhas foram mais danosos às plântulas de trevo-branco (*Trifolium repens* L., Fabaceae) em relação ao extrato de raízes (FAVARETTO et al., 2011). Isso induz à hipótese de que as concentrações dos aleloquímicos sejam distintas nesses órgãos, indicando a importância da sua quantificação. A continuidade de trabalhos relacionados à fitoquímica do capim-annoni é importante para determinar os grupos químicos nesta gramínea. Devido à variedade de atuação dos compostos com propriedades alelopáticas, como é o caso dos alcaloides e compostos fenólicos, eles são considerados como recurso para o desenvolvimento de herbicidas naturais, além de serem utilizados para controle de doenças em plantas (BHADORIA, 2011).

As duas principais estratégias empregadas pelas plantas para sobreviver são o armazenamento de nutrientes e defesas contra ameaças externas. No primeiro caso, a planta armazena substâncias durante seu crescimento vegetativo para serem utilizadas em períodos de frio ou de seca e para rebrotar após um corte ou pastejo. No segundo caso, a planta sintetiza compostos como lignina, cutina,

fenóis, terpenoides e alcaloides para conferir-lhe resistência ao vento, doenças e desfolhação (CARVALHO & PIRES, 2008). No capim-annoni, essas duas estratégias estão representadas pela presença de amido na raiz e pela detecção de fenóis, alcaloides e lignina.

4 CONCLUSÕES

O capim-annoni possui fenóis, alcaloides e lignina nas folhas e raízes; aerênquima e medula parenquimática armazenadora de amido na raiz, sugerindo aspectos adaptativos que podem explicar sua persistência sob estresses bióticos e abióticos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; HAMEED, M.; TAREEN, R. B.; ZAFAR, M.; JABEEN, A. Taxonomic application of foliar anatomy in grasses of tribe Eragrostideae (Poaceae) from salt range of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 43, n. 5, p. 2277-2284, 2011.
- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal*, Madison, v. 81, n. 1, p. 17-25, 1989.
- AL-SHERIF, E.; HEGAZY, A. K.; GOMAA, N. H.; HASSAN, M. O. Allelopathic effect of black mustard tissues and root exudates on some crops and weeds. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 11-19, 2013.
- ALVES, P. L. C. A.; TOLEDO, R. E. B.; GUSMAN, A. B. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp. In: NARWAL, S. S. (Ed.). *Allelopathy Update*. Enfield: Science Pub, 1999. p. 131-148.
- ALVES, S. M.; SOUZA FILHO, A. P. S. Natureza química dos agentes alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Eds.). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa, 2002. p. 25-47.
- ASCENSÃO, L. *Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado*. Botucatu: UNESP, 2003. 20 p.
- BAIS, H. P.; VEPECHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, Washington, v. 301, n. 5638, p. 1377-1380, 2003.
- BALERONI, C. R. S.; FERRARESE, M. L. L.; SOUZA, N. E.; FERRARESE-FILHO, O. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v. 43, n. 2, p. 313-316, 2000.

BALSAMO, R. A.; ORKWISZEWSKI, J. A. J. Leaf architecture, lignification, and tensile strength during vegetative phase change in *Zea mays*. *Acta Societatis Botanicorum*, Wroclaw, v. 77, n. 3, p. 181-188, 2008.

BALSAMO, R. A.; WILLIGEN, C. V.; BAUER, A. M.; FARRANT, J. Drought tolerance of selected *Eragrostis* species correlates with leaf tensile properties. *Annals of Botany*, Leicester, v. 97, n. 6, p. 985-991, 2006.

BHADORIA, P. B. S. Allelopathy: a natural way towards weed management. *American Journal of Experimental Agriculture*, Kharagpur, v. 1, n. 1, p. 7-20, 2011.

BLUM, U. *Plant-Plant allelopathic interactions: Phenolic Acids, Crop Cover and Weed Emergence*. London: Springer, 2011. 48 p.

BOECHAT, S. C.; LONGHI-WAGNER, H. M. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Eragrostis* (Poaceae, Chloridoidea). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 177-194, 2000.

BRASIL. Resolução executiva nº 899 de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Brasília: Visalegis, 2003. 15 p.

BRASIL. Resolução CONABIO nº 05, de 21 de outubro de 2009. *Dispõe sobre a estratégia nacional para espécies exóticas invasoras*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2009a. 27 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: MAPA, 2009b. 399 p.

BUSH, L.; BURTON, H. Intrinsic chemical factors in forage quality. In: FAHEY, J. R. (Ed.). *Forage quality, evaluation, and utilization*. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 367-405.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e sua implicação para os ruminantes. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 57, p. 13-28, 2008.

CHINI, S. O. *Taninos e flavonoides em Lotus spp.* 2013. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração em Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

CHOU, C. H. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. IV. Comparative phytotoxic nature of leachate from four subtropical grasses. *Journal of Chemical Ecology*, Berlin, v. 15, n. 7, p. 2149-2159, 1989.

CHUNG, I. M.; AHN, L. K.; YUN, S. J. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, Pullman, v. 20, n. 10, p. 921-928, 2001.

COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim-annoni-2. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 3, p. 255-263, 1986.

COLPAS, F. T.; OHNO, J. D.; RODRIGUES, J. D.; PASS, J. D. D. S. Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed borne fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 46, p. 155-161, 2003.

COSTA, A. F.; PROENÇA DA CUNHA, A. *Farmacognosia*. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2000. 172 p.

COSTA, F. F.; LIMA, H. R. P.; CUNHA, M. da; SANTOS, I. da S. Leaf Anatomy and histochemistry of *Macropeplus dentatus* (Perkins) I. Santos & Peixoto and *Macropeplus ligustrinus* (Tul.) Perkins (Monimiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 852-861, 2010.

DANIEL, O.; MEIER, M. S.; SCHLATTER, J.; FRISCHKNECHT, P. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, Minneapolis, v. 107, n. 1, p.109-114, 1999.

DANTAS, B. F.; ARAGAO, C. A.; ALVES, J. D. Cálculo e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, 2001.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: REIGOSA, M. E.; PEDROL, N. L. *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Holanda: Spring Verlag, 2006. p. 611-624.

DELISTOIANOV, J.; TOLEDO, A. P. Estudo anatômico para localização do óleo em raiz de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Bragantia*, Campinas, v. 19, n. 55, p. 891-896, 1960.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, Pullman, v. 19, n. 8, p. 583-589, 2000.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and mode of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. (Eds.) *The science of allelopathy*. New York: John Willey & Sons, 1986. p. 171-188.

ELLIS, R. P. *Eragrostis walteri* – a 1st record of non-Kranz anatomy in the subfamily Chloridoideae (Poaceae). *South African Journal of Botany*, Pietermaritzburg, v. 3, p. 380-386, 1984.

EL-KHATIB, A. A.; HEGAZY, A. K.; GALA, H. K. Does allelopathy have a role in the ecology of *Chenopodium murale*? *Annales Botanici Fennici*, Helsinki, v. 41, p. 37-45, 2004.

EVANS, D. E. Aerenchyma formation. *New Phytologist*, Oxford, v. 161, p. 35-49, 2003.

FAHN, A. *Plant Anatomy*. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1990. 588 p.

FARMACOPÉIA. *Farmacopéia Brasileira*. Brasília: Anvisa, 2010. 545 p.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; ZOCH NETO, A.; CARNEIRO, C. M. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 40, n. 6, p. 1168-1172, 2011.

FERNANDES, S. D. da C. *Morfologia, anatomia, histoquímica e aspectos fisiológicos da lâmina foliar de espécies de Clusia (Clusiaceae)*. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B.; SOARES, G. L. Potencial alelopático de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas estivais. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 30, n. 2, p. 43-50, 2008.

FIGUEIREDO, A. C. da S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. *Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos*. Lisboa: REPRO, 2007. 80 p.

FOCHT, T. *Ecologia e dinâmica do capim-annoni (Eragrostis plana Nees.), uma invasora dos campos sulinos: prevenção da sua expansão*. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FONSECA, M. C. M.; MEIRA, R. M. S. A.; CASALI, V. W. D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos

fenólicos e lipídios em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). *Planta Daninha*, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 707-713, 2006.

FREITAS, G. K.; PIVELLO, V. A Ameaça das Gramíneas Exóticas à Biodiversidade. In: PIVELLO, V. R.; VARANDA, E. M. (Org.). *O Cerrado Pé-de-Gigante* (Parque Estadual de Vassununga, São Paulo). São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006. p. 283-296.

FRIGHETTO, R. T. S.; BACCAN, M. *Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [Glycine max (L.) Merrill] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. (Documento técnico, 90).

FUMAGALI, E; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GNIASZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants: Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiology*, Heidelberg, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GUENZI, W. D.; MCCALLA, T. M. Phenolic acids in oats, wheat, sorghum, and corn residues and their phytotoxicity. *Agronomy Journal*, Madison, v. 58, n. 3, p. 303-304, 1966.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. *Biotemas*, Florianópolis, v. 25, n. 4, p. 37-48, 2012.

HE, C. N.; GAO, W. W.; YANG, J. X.; BI, W.; ZHANG, X. S.; ZHAO, Y. J. Identification of autotoxic compounds from fibrous roots of *Panax quinquefolium* L. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 318, n. 2, p. 63-72, 2009.

HIERRO, J. L.; CALLAWAY, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 256, n. 1, p. 29-39, 2003.

HONG, N. H.; XUAN, T. D.; EIJI, T.; KHANH, T. D. Paddy weed control by higher plants from Southeast Asia. *Crop Protection*, Pullman, v. 23, n. 3, p. 255-261, 2004.

HOULT, A. H. C.; LOVETT, J. V. Biologically active secondary metabolites of barley: a method for identification and quantification of hordenine and gramine in barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chemical Ecology*, Berlin, v. 19, n. 10, p. 2245-2254, 1993.

IAS – International Allelopathy Society. *Constitution and Bylaw of IAS*. Cadiz: IAS Newsletter, 1996. 12 p.

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, 2003.

INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*, Nova York, v. 61, p. 28-44, 1995.

INDERJIT; WEINER, J. Plant allelochemical interference on soil chemical ecology? *Perspectives in Plant Ecology Evolution Systematics*, Zurich, v. 4, p. 4–12, 2001.

INGRAM, A. L. Evolution of leaf blade anatomy in *Eragrostis* (Poaceae). *Systematic Botany*, Washington, v. 35, n. 4, p. 755-765, 2010.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KING, S. R.; AMBIKA, R. Allelopathic plants. *Chromolaena odorata* (L.). *Allelopathy Journal*, Haryana, v. 9, n. 1, p. 35-41, 2002.

KISSMANN, K. G. *Plantas Infestantes e Nocivas*. São Paulo: Basf Brasileira, 1991. 603 p.

KRUSE, M.; STRANDBERG, M.; STRANDBERG, B. *Ecological effects of allelopathic plants - A review*. Silkeborg: NERI, 2000. (Boletim técnico, 315).

LEATHER, G. R.; ENHELLIG, F. A. Potential for allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology*, Berlin, v. 14, n. 10, p. 1829-1844, 1988.

LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, Basileia, v. 15, n. 12, p. 8933-8952, 2010.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N. da; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. D.; ARRUDA, J. M. S. P.; SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

MACÍAS, F. A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J. M. G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Reviews*, Marburg, v. 7, p. 179-194, 2008.

MALCOLM, C. D.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, Londres, v. 5, n. 3, p. 123-127, 2000.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Iheringia*, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 91-98, 2005.

MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 141 p.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Acta Botânica Brasílica*, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MEDEIROS, R. B.; PILLAR, V. P.; REIS, J. C. R. Expansão de *Eragrostis plana* Ness. (capim-annoni) no Rio Grande do Sul e indicativos de controle In: REUNIÓN DEL GRUPO TÉCNICO REGIONAL DEL CONO SUR EN MEJORAMIENTO Y UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS FORRAJEROS DEL ÁREA TROPICAL Y SUBTROPICAL GRUPO CAMPOS, 30., 2004, Salto. *Anais...* Salto: Universidad de la Republica, 2004. p. 211-212.

MEDEIROS, R. B.; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre, v. 13, n. 1-2, p. 105-144, 2007.

MEINERS, S. J.; KONG, C. H.; LADWIG, L. M.; PISULA, N. L.; LANG, K. A. Developing an ecological context for allelopathy. *Plant Ecology*, Perth, v. 213, p. 1861-1867, 2012.

MICKOVISK, S. B.; VAN BEEK, L. P. H. Root morphology and effects on soil reinforcement and slope stability of young vetiver (*Vetiveria zizanioides*) plants grown in semi-arid climate. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 324, p. 43–56, 2009.

MILLER, D. A. Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal*, Madison, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.

NASCIMENTO-SILVA, O.; CHINALIA, L. A.; PAIVA, J. G. A. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae). *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 21, n. 3, p. 62-68, 2008.

NASCIMENTO, A.; HALL, G. A. B. Estudos comparativos de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) e pastagem nativa de várzea da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 1. Características químico-bromatológicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 7-14, 1978.

NELSON, C. J. Photosynthesis and carbon metabolism. In: BARNER, F. R. *Forages: An introduction to grassland agriculture*. 5. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1995. p. 31-43.

OGIE-ODIA, E. A.; ESEIGBE, D.; ILECHIE, M. N.; ERHABOR, J.; OGBEBOR, E. Foliar epidermal and phytochemical studies of the grasses *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Axonopus compressus* (P. Beauv.) and *Eragrostis tremula* (S.W. Beauv.) in Ekpoma, Edo State, Nigeria. *Science World Journal*, Nova York, v. 5, n. 1, p. 20-24, 2010.

OLIVEIRA, S. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. *Allelopathy Journal*, Haryana, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2004.

OLIVEIRA, S. C. C.; GUALTIERI, S. C. J.; DOMÍNGUEZ, F. A. M.; MOLINILLO, J. M. G.; MONTOYA, R. V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 26, n. 3, p. 607-618, 2012.

ONG, M. H.; JUMEL, K.; TOCARKZUK, P. F.; BLANSHARD, J. M. V.; HARDING, S. E. Simultaneous determination of the molecular-weight distributions of amylases and the fine structures of amylopectins of native starches. *Carbohydrate Research*, Londres, v. 260, p. 99-117, 1994.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 357-364, 2002.

PARVEZ, S. S.; PARVEZ, M. M.; FUJII, Y.; GEMMA, H. Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 41, p. 139-148, 2003.

PEREIRA, B. F.; SBRISSIA, A. F.; SERRAT, B. M. Alelopatia intra-específica de extratos aquosos de folhas e raízes de alfafa na germinação e no crescimento inicial de plântulas de dois materiais de alfafa: crioulo e melhorado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 561-564, 2008.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J. (Org.). *Plantas daninhas e seu manejo*. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p. 145-185.

POLITYCKA, B.; KOZLOWSKA, M.; MIELCARZ, B. Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. *Allelopathy Journal*, Haryana, v. 13, p. 29-36, 2004.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de. How and why to measure de germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

RAZAVI, S. M. Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry*, Nova York, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; GONZALEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Apopka, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

REINHARDT, C. F.; BEZUIDENHOUT, S. R. Growth stage of *Cyperus esculentus* influences its allelopathic effect on ectomycorrhizal and higher plant species. In: KOHLI, R. K.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R. (Eds.). *Allelopathy in agroecosystems*. Binghamton: Food Products Press, 2001. p. 323-333.

REIS, J. C. L. *Capim-annoni*: origem, morfologia, características, disseminação. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 1993. (Documento técnico, 7).

REIS, J. C. L.; COELHO, R. W. *Controle do capim-annoni em campos naturais e pastagens*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. (Circular Técnica, 22).

RENVOIZE, S. A. A. Survey of leaf-blade anatomy in grasses. IV. Eragrostideae. *Kew Bulletin*, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 469-478, 1983.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J. P.; MATSUMOTO, R. S.; TADAO, L. K.; VOLTARELLI, V. M.; LIMA, M. I. S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 183-188, 2009.

RICE, E. L. *Allelopathy*. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Exploration of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Eds.). *Allelopathy*. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 443-472.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 123, n. 2, p. 725-732, 2000.

SANCHEZ, M. G.; KOCH, S. D. Estudio anatomico comparativo de la lamina foliar de *Eragrostis* (Poaceae: Chloridoideae) de Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, Michoacán, v. 43, p. 33-56, 1998.

SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; WEISS, O. A.; REIGOSA-ROGER, M. J. Allelopathic evidence in the Poaceae. *The Botanical Review*, Nova York, v. 69, n. 3, p. 300-319, 2004.

SANTOS, V. H. M. dos. *Potencial alelopático de extratos e frações de Neea theifera Oerst. (Nyctaginaceae) sobre sementes e plantulas de Lactuca sativa*. 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

SANTOS, C. C. dos; OLIVEIRA, D. F. de; ALVES, L. W. R.; DE FURTADO, D. A. S. Effect of organic extracts associated with surfactante tween 80 on seed germination and seedling growth of lettuce. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 2, p. 296-299, 2004.

SANTOS, M. C. A.; FREITAS, S. de P.; AROUCHA, E. M. M.; SANTOS, A. L. A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2009.

SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; REZENDE, M. O. O.; SOUZA FILHO, A. P. S. Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. *Eclética Química*, Araraquara, v. 36, n. 2, p. 51-68, 2011.

SCHNEIDER, A. A. A flora naturalizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil: herbáceas subspontâneas. *Biociências*, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 257-268, 2007.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVA, R. J. F.; POTIGUARA, R. C. de V. Substâncias ergásticas foliares de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae): caracterização histoquímica e ultra-estrutural. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 39, n. 4, p. 793-798, 2009.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. *Biotemas*, Florianópolis, v. 25, n. 3, p. 65-74, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 821 p.

SOARES, J. L. G.; VIEIRA, T. R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "grandrapids") por extratos

aqueos de cinco espécies de *Gleicheniaceae*. *Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 180-197, 2000.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, T. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S.; TREZZI, M. M.; IOUE, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 709-716, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 719 p.

TANVEER, A.; JABBAR, M. K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R. N.; JAVAID, M. M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam on germination and seedling growth of chickpea and wheat. *Chilean Journal of Agricultural Research*, Chillán, v. 74, n. 4, p. 495-501, 2012.

TREZZI, M. M. *Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo*. 2002. 132 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, Nova York, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, Pessac, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2. ed. Berlin: Springer, 2001. 384 p.

WAIBEL, R.; BENIRSCHKE, G.; BENIRSCHKE, M.; ACHENBACH, H. Sesquiterpene lactones and other constituents from the

seeds of *Joannesia princeps*. *Phytochemistry*, Pullman, v. 62, n. 5, p. 805-811, 2003.

WESTON, L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Apopka, v. 22, n. 3-4, p. 367-389, 2003.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, Toronto, v. 171, n. 3, p. 757-770, 1971.

WILSON, J. R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science*, Toronto, v. 122, n. 2, p. 173-182, 1994.

YAMAGUSHI, M. Q.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Semina*, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1361-1374, 2011.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. C. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: AGROS, 2001. p. 17-46.

ZENNI, R. D.; ZILLER, S. R. An overview of invasive plants in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 431-446, 2011.