



Universidade Federal do Pampa
Campus São Gabriel

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

DANIELLE BIZZI DOTTO

São Gabriel (RS), Brasil
Maio de 2013

DANIELLE BIZZI DOTTO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a Alexandra Augusti Boligon

**São Gabriel
2013**

Dotto, DanielleBizzi
Análise fitoquímica e atividade antioxidante
de extratos de capim-annoni-2 (*Eragrostis
plana Nees*)/ Danielle Bizzi Dotto. Data. 21
de maio de 2013. Número de folhas: 29;
tamanho (A4).

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado)
Universidade Federal do Pampa. Data de
defesa: 21 de maio de 2013. Orientação:
Alexandra Augusti Boligon

1. Botânica. 2. Fisiologia Vegetal. 3.
Bioquímica. I. Boligon, Alexandra Augusti.
II. Título Doutor

DANIELLE BIZZI DOTTO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a ALEXANDRA AUGUSTI BOLIGON

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Monografia defendida e aprovada em: 21 de maio de 2013.
Banca examinadora:

Orientador Prof^a. Alexandra Augusti Boligon
Universidade Federal do Pampa

Prof^a. Silvane Vestena
Universidade Federal do Pampa

Aline Augusti Boligon
Universidade Federal de Santa Maria

Dedico esta monografia a minha mãe Ivonir e ao meu namorado Jean Savian, maiores incentivadores de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por mais esta etapa vencida.

Aos meus familiares, ao meu irmão Bruno e principalmente a minha mãe Ivonir, pelo incentivo, apoio, paciência e amor, permitindo a conclusão de mais uma etapa importante da minha vida.

Ao meu namorado Jean Victor Savian, que em todos os momentos, tanto de angústias como os de alegria, esteve presente apoiando-me incondicionalmente e também pelo carinho amor e ajuda

A Prof. Dr^a Alexandra Augusti Boligon pela orientação, paciência e a constante troca de conhecimentos.

A Universidade Federal do Pampa pela oportunidade de realizar esse curso.

A equipe de professores da universidade pela amizade e ensinamentos passados durante o curso.

A Aline Augusti Boligon pela ajuda na análise e interpretação dos dados.

As colegas Mariana, Vanessa, Priscila, Clarissa pelas discussões durante os estudos e pela amizade no decorrer do curso.

“Não "afrouxemo" nem nos "lançante"
Pois "semo" loco de dá com um pau
"Cruzemo" a nado se o rio não dá vau
Neste mundo "véio" flor de cabuloso”

César Oliveira

RESUMO

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma espécie exótica, pertencente à família Poaceae, sendo considerada invasora de pastagens com introdução acidental no Rio Grande do Sul na década de 1950. Vários trabalhos comprovam que o capim-annoni-2 apresenta efeito alelopático sobre diversas espécies, o que pode ser um dos fatores responsáveis pelo potencial invasor do mesmo. O presente estudo objetivou determinar o potencial antioxidante e identificar e quantificar compostos químicos presentes no capim-annoni-2 que possam estar relacionados com a atividade alelopática desta espécie. Para realização desse estudo, foram coletadas as partes aéreas de plantas localizadas no município de São Gabriel – RS, sendo o material seco em estufa a 60°C durante 72 horas e, após, moído em um moinho tipo Willey. Para realização dos experimentos foram utilizados o extrato metanólico e a infusão do capim-annoni-2. A quantificação de polifenóis, flavonóides e taninos totais foi realizada por espectrofotômetro. A atividade antioxidante foi medida pelo método do DPPH (2,2 difenol, 1-picriluidrozila), considerando o ácido ascórbico como padrão. Ainda, foram quantificadas as substâncias ácido elágico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, rutina, quercetina, epicatequina e catequina, através de análises em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 5% de significância. Quando detectadas diferenças, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Observou-se uma maior extração de compostos ao extrato metanólico quando comparado à infusão. No extrato metanólico, o composto encontrado em maior quantidade foi o ácido elágico e em menor concentração de catequina (34,05mg/g e 8,16mg/g, respectivamente). Já na infusão a substância que apresentou maior quantificação foi o ácido cafeico e em menor quantidade a quercetina (33,15mg/g e 7,42mg/g, respectivamente). Na avaliação da atividade antioxidante, observou-se que o comportamento do extrato metanólico seguiu o mesmo padrão do ácido ascórbico (padrão) para a atividade antioxidante do capim-annoni-2, apresentando um aumento da atividade antioxidante até a concentração de 70µg/ml, estabilizando após estar em 80% de atividade antioxidante, aproximadamente. Assim, conclui-se que o uso do extrato metanólico apresenta maior extração dos compostos químicos do capim-annoni-2, comparado com a infusão. O potencial antioxidante foi melhor para o extrato metanólico, comparado à infusão.

Palavras-chave: Alelopatia, cromatografia líquida, extrato metanólico, fenóis, flavonóides, infusão, tanino.

ABSTRACT

The capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) is an invasive exotic Poaceae pasture and allelopathic potential, which was accidentally introduced in Rio Grande do Sulat 1950. This study aimed to determine the potential antioxidant, identify and quantify some chemical compounds present in capim-annoni-2 which may be related to the allelopathic activity. To conduct this study, aerials parts of the capim-annoni-2 were collected in São Gabriel county, RS. After sampling of the material, the plants were dried in estufa 60 ° C for 72 hours, and then were ground in a Willey mill type for further carrying out the analysis. Experiments were performed with methanolic extract an infusion of capim-annoni-2. The quantification of phenols, flavonoids and tannins total was carried by spectrophotometer. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) at 5% level of significance. When differences were detected, means were compared by Tukey test ($P < 0.05$). It was observed a higher extraction by methanol extract when compared to the method of infusion. In the methanol extract, were found: ellagic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, rutin, quercetin, epicatechin and catechin, with the highest concentration of ellagic acid and lower concentration of catechin (34.05 mg / g and 8.16 mg / g, respectively). There are already infused in the same compounds with a higher concentration of caffeic acid and lower concentration of quercentina (33.15 mg / g 7.42 mg / g, respectively). It is observed that the behavior of the methanol extract followed the same pattern of ascorbic acid (standard) to the antioxidant activity, showing an increase in antioxidant activity up to a concentration of 70µg/ml, stabilizing after being in 80% of antioxidant activity, approximately. Thus, it is concluded that the use of methanol extract has a greater extraction of chemical compounds from the capim-annoni-2, compared with infusion. The potential antioxidant was better for methanol extract, compared to infusion.

Keywords: Allelopathy, liquid chromatography, methanol extractphenols, flavonoids, infusion, tannin.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.OBJETIVO.....	14
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Coleta do material	18
4.2 Quantificação de compostos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ..	18
4.3 Doseamentos	19
4.3.1 Atividade antioxidante pelo DPPH	19
4.3.2 Determinação de polifenóis	20
4.3.3 Determinação de flavonóides totais.....	20
4.3.4 Determinação de taninos condensados	21
4.4 Análise Estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1.INTRODUÇÃO

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) pertence à família Poaceae, sendo classificada como uma planta perene, estival e cespitosa. É nativa da África do Sul e está presente em várias regiões do Rio Grande do Sul (RS) (REIS e COELHO, 2000), sendo considerada a invasora mais agressiva e de mais difícil controle em pastagens naturais no sul do Brasil (REIS, 1993).

O capim-annoni-2 foi introduzido acidentalmente no RS na década de 1950, como impurezas nos lotes de capim-de-rhodes (*Chloris gayana* Kunth) importados da África do Sul, local onde o capim-annoni-2 também é considerado uma planta indesejável (KIRKMAN e MORRIS, 2003). Desde seu aparecimento no estado o Grupo Rural Annoni de Sarandi, RS, passou a produzir e a comercializar suas sementes, pois foi inicialmente considerada uma ótima forrageira devido à grande produção de massa verde, porte vigoroso, adaptação a solos secos a moderadamente drenados e tolerância às flutuações do clima, especialmente na geada. A distribuição de sementes aumentou ainda mais a pressão de propágulos e acelerou o processo invasor.

Pesquisas na década de 1970 mostraram que essa planta não possuía vantagens forrageiras sobre o campo natural, devido apresentar longa fase reprodutiva, presença de alelopatia, o qual prejudica a germinação de sementes de diversas espécies nativas e exóticas, longevidade das sementes no solo, formando banco de sementes persistentes, e baixa qualidade nutricional, além de ocupar facilmente campos e pastagens. As pesquisas também mostraram que a planta na fase adulta era rejeitada pelos animais. Ainda, foi verificado que a espécie apresentava características de planta nociva e de grande invasora, com fácil e rápido estabelecimento via sementes. Com base nesses estudos, em 1979 o Ministério da Agricultura publicou a portaria MA nº 205, proibindo a comercialização, transporte, importação e exportação de sementes e mudas de capim-annoni-2 no RS.

A invasão do capim-annoni-2 já é um fenômeno de escala geográfica no RS, com presença também em outros estados, como Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, e já ocupa áreas expressivas de pastagens nativas no Uruguai e na Argentina (MEDEIROS et al., 2009). Não existem levantamentos conclusivos sobre sua cobertura no RS, mas estima-se que a área infestada pelo capim-annoni-2 como invasora e/ou dominante seja superior a um milhão de hectares, ou aproximadamente 10% da área do Bioma Pampa do RS (MEDEIROS et al., 2004).

Para controlar a invasão do capim-annoni-2, vários estudos têm sido efetuados usando diferentes abordagens, como prevenir a ocorrência em áreas livres e diminuir a disseminação (BRUNING et al., 2006). Com base nisso, é importante conhecer as estratégias e vantagens que compete à planta. Existem vários fatores que contribuem para a disseminação e estabelecimento do capim-annoni-2, como a produção de sementes em grande quantidade e a alta taxa de germinação destas (COELHO, 1983), tornando a espécie de difícil eliminação.

Além disso, o capim-annoni-2 usa sua estratégia para competir e dominar comunidades vegetais liberando metabolitos secundários, compostos que podem afetar o crescimento, prejudicar o desenvolvimento e até mesmo inibir a germinação de outras espécies. A alelopatia é um efeito de uma planta sobre a outra, através da liberação de substâncias químicas no ambiente que apresentam ação de forma direta ou indireta sobre espécies vizinhas em seu desenvolvimento (RICE et al., 1984). Essas substâncias estão presentes em toda a planta, principalmente nas folhas e raízes, que são liberadas no ambiente por compostos solúveis em água. Essas agem na fisiologia das plantas, sobre o alongamento e divisão celular, interferem nos mecanismos hormonais de crescimento, abertura estomática, fotossíntese e respiração (FERREIRA et al., 2008).

Apesar de serem encontrados inúmeros trabalhos na literatura relacionados ao capim-annoni-2, poucos se referem ao poder alelopático da espécie. Além disso, inexistem trabalhos que descrevem e quantificam substâncias presentes nesta espécie que podem possuir relação com seu poder alelopático sobre outras espécies.

2. OBJETIVO

Identificar e quantificar compostos químicos presentes no capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) que possam estar relacionados com a atividade alelopática.

Determinar o potencial antioxidante do extrato metanólico e da infusão do capim-annoni-2.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A gramínea *E. plana* Nees (capim-annoni-2) é originária da África, classificada como perene de estação quente, e foi introduzida por acaso no RS na década de 1950. Inicialmente era vista como uma planta forrageira de boa qualidade, pois chamava a atenção pelo seu porte vigoroso e alta produção de massa verde (REIS e COELHO, 2000). No entanto, devido a sua alta capacidade de propagação e invasão tornou-se um grande problema para a pecuária e agricultura do estado. Em termos de produção de forragem e nutrição animal, esta espécie não apresenta vantagens sobre o campo natural, em relação às espécies de campo nativo (GONZAGA e SOUZA, 1999). Devido ao seu caráter de planta nociva e de grande invasora, acredita-se que em torno de dois milhões de hectares de terras do RS já tenham o capim-annoni-2 como espécie dominante e/ou invasora (MEDEIROS, et al., 2004), e esta já começou a se expandir para o Mercosul, tomando conta das margens das estradas argentinas e uruguaias, o que evidencia sua expansão descontrolada (MACIEL, 2003). Com base nesses dados, a partir da década de 1979 o Ministério da Agricultura publicou a portaria MA nº 205, proibindo a comercialização, importação, exportação de sementes e mudas de capim-annoni-2 no RS.

Estudos visando o controle ao capim-annoni-2, vêm sendo efetuados usando diferentes abordagens, como prevenir a ocorrência da expansão em áreas livres e diminuir a sua disseminação (BRUNING et al., 2006). É importante conhecer as características que conferem competitividade a esta planta, para aplicar qualquer prática de controle. De acordo com Reis (1993), alguns mecanismos são considerados os agentes responsáveis pela sua invasão e disseminação, (REIS e COELHO, 2000), como grande produção de sementes viáveis, competitividade por nutrientes, água e luz, além de seu poder alelopático sobre outras espécies (FERREIRA, et al., 2006). Estas características variam com o tipo de solo, de vegetação, de maior ou menor abertura da comunidade vegetal, entre outros.

A alelopatia, é um fenômeno que ocorre largamente em comunidades de plantas, interferindo no desenvolvimento de outras (SMITH, 1989), prejudicando ou favorecendo o segundo. O efeito é realizado por metabólitos secundários produzidos por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou do substrato (RIZVI et al., 1992). Entre as rotas de liberação das substâncias alelopáticas por uma planta inclui-se a volatilização pelas partes aéreas da planta, a lixiviação das superfícies do vegetal através da chuva, orvalho, neblina e a exsudação pelas raízes (ANAYA, 1999), essas podem afetar no crescimento,

prejudicar o desenvolvimento e também inibir a germinação das sementes de outras espécies (SILVA, 1978).

A alelopatia é reconhecida como um processo ecológico importante em ecossistemas naturais e manejados, influenciando na sucessão vegetal primária e secundária, na estrutura, composição e dinâmica de comunidades vegetais nativas ou cultivadas (SCRIVANTI et al., 2003). Os aleloquímicos são vistos como alternativas aos agroquímicos sintéticos, objetivando o manejo sustentável e ecológico na produção agrícola. Muitas substâncias alelopáticas apresentam grande potencial para uso no controle biológico de plantas invasoras (CHUNG et al., 2001).

As substâncias alelopáticas estão presentes em todos os seres vivos, mas essas são encontradas em maior quantidade e diversidade nas plantas, as quais se distribuem por todo o órgão, mas geralmente a concentração é maior na epiderme das folhas e nas raízes (GATTI et al., 2004)

Para Iganci et al. (2006) a união das condições ambientais e o efeito dos metabólitos secundários resultam na ação alelopática. Compostos fenólicos, flavonóides e taninos estão associados com o efeito alelopático (EINHELLIG, 1986).

Os polifenóis são produtos de baixo peso molecular e são considerados de máximo interesse por se encontrar ligados à maior parte de fenômenos biológicos, botânicos e taxonômicos. Devido à grande diversidade de formação de processos metabólicos na formação de substâncias fenólicas, é difícil estimar o seu teor quantitativo nos tecidos das plantas, pois cada espécie vegetal está associada a uma determinada família de polifenóis como mais importante, cujos teores aumentam com a idade e variam com o desenvolvimento vegetativo da planta (EVARISTO e LEITÃO, 2001). Esses apresentam funções como inibidores de crescimento, possuem propriedades de defesas das plantas e também apresentam mecanismos de proteção ao stress ambiental (FEUCHR et al., 1994).

Os flavonóides são amplamente distribuídos na natureza, constituem um grupo de pigmentos vegetais responsáveis pela coloração de flores, frutos e folhas (ROBBERS et al.; 1996) e também constituem uma importante classe de polifenóis presentes entre os metabólitos secundários de plantas. Os flavonóides além de desempenhar função de defesa, atuar como antioxidante, sinalizadores de processos reprodutivos, podem no ambiente ter efeito significativo na composição dos solos, contribuindo nas interações planta-planta e planta microorganismos (SHIRLEY, 1996).

Taninos são compostos secundários, de grande interesse econômico e ecológico, estão presentes na maioria das plantas, que podem variar de concentração nos tecidos

vegetais, dependendo da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (TEIXEIRA et al., 1990). Devido a presença dos taninos nas plantas, esses competem uma habilidade de defesa contra inimigos naturais, como herbívoros e microorganismos patogênicos (ZUCHER, 1938). Conforme Metche (1980), a ação desses compostos sobre os herbívoros, estariam implicados no processo digestivo dos animais, dificultando a produção de enzimas digestivas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material

Para a realização do experimento o capim-annoni-2 foi coletado no campus da Universidade Federal do Pampa, São Gabriel - RS. O material foi mantido em estufa de ar forçado a 60°C durante 72 horas, para a obtenção da matéria parcialmente seca. Após, toda a matéria seca foi moída em um moinho tipo Willey.

A partir do material moído, foi realizado o preparo dos extratos, utilizando-se duas formas de extração: maceração com metanol e infusão com água, 200g do material vegetal moído foi adicionado à 1L de metanol, após agitação por dois dias foi filtrado e evaporado obtendo-se o extrato metanólico. A infusão foi realizada com 200g de material vegetal seco com 1L de água destilada, o material foi filtrado e evaporado em estufa a 40°C, obtendo-se assim os extratos utilizados nas análises posteriores.

4.2 Quantificação de compostos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)

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

As análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa, sob condições de gradiente, utilizando coluna C18 (4,6 mmx150 mm) carregada com partículas de diâmetro 5µm. A fase móvel foi utilizada água contendo 2% de ácido acético(A) e metanol (B) (KAMDEM et al., 2012).

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

4.3 Doseamentos

4.3.1 Atividade antioxidante pelo DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico do DPPH (2,2-difenil,1-picrihidrazila), segundo (BOLIGON et al., 2009). Foram utilizados o extrato metanólico e infusão de *E. plana* nas concentrações de: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL em etanol (2,5 mL). A 2,5 mL de cada amostra foi adicionado 1mL da solução de DPPH 0,3mM em etanol. Após 30 minutos, foram feitas as leituras, em espectrofotômetro (Shimadzu - UV-1201) das absorbâncias a 518nm. Uma solução de DPPH (1mL; 0,3mM) em etanol (2,5mL) foi usada como controle negativo e o ácido ascórbico como padrão (controle positivo), nas mesmas concentrações das amostras. O etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro, tendo como brancos as soluções testes de cada amostra (sem adição do

DPPH), visando minimizar a interferência de componentes das amostras na leitura. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da atividade antioxidante seguiu a equação:

$$\% \text{inibição} = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \times 100$$

Onde: $Abs_{amostra}$ é a absorbância da fração e do extrato liofilizado; Abs_{branco} é a absorbância das frações e do extrato liofilizado sem adição do DPPH e $Abs_{controle}$ é a absorbância da solução de DPPH em etanol. Foi calculada a porcentagem de inibição do radical DPPH e construído um gráfico de porcentagem de inibição versus concentração do extrato e das frações.

4.3.2 Determinação de polifenóis

A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu, seguindo o método descrito por (BOLIGON et al. 2009), utilizando 0,15 mg/mL do extrato metanólico e infusão de *E. plana*. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730nm, em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de planta seca. A equação obtida para a curva padrão do ácido gálico foi $y = 52.167x - 0.0631$ ($r = 0.9999$).

4.3.3 Determinação de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 1mL de uma solução da amostra (150µg/mL) do extrato metanólico e infusão de *E. plana* foram adicionados 0,5mL de uma solução de $AlCl_3$ 2%. Após 15 minutos, as absorbâncias foram lidas em 420nm. Os testes foram realizados em

triplicata e para o cálculo do doseamento de flavonóides utilizou-se a curva padrão de quercetina ($Y = 0.0045x - 0,014$ ($r = 0,9997$)). Os teores de flavonóides foram determinados em miligrama de quercetina por grama de planta seca.

4.3.4 Determinação de taninos condensados

O teor de taninos foi realizada utilizando o método descrito por (MORRISON et al., 1995) com algumas modificações. As amostras, em concentrações de 0,25 mg/mL, 5 mL da solução A (1 g de vanilina em 100 mL de metanol) e solução B (8 mL de HCl em 100 mL de metanol) foram utilizados para ensaio. As amostras foram lidas a 500 nm num espectrofotômetro. O teor de tanino total foi expresso em miligramas equivalentes de catequina por grama de cada fracção. A equação obtida para a curva de calibração de catequina foi $Y = 0.00015x - 0,005$ ($r = 0,9989$). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados de fenóis, flavonóides e taninos encontrados do extrato de capim-annoni-2. Observa-se uma maior extração do extrato metanólico comparado a infusão, esse resultado já é esperado devido à utilização do metanol como extrator, ao contrário da infusão, que utiliza apenas água para a extração. Os fenóis foram extraídos em maior quantidade tanto no extrato metanólico quanto na infusão, quando comparados aos flavonóides e taninos.

Os fenóis são altamente distribuídos nos vegetais, apresentando propriedades de sabor, odor e coloração. Devido a essas propriedades os mesmos possuem características de defesa nas plantas, na inter-relação de animais e vegetais, na atividade de inibição da germinação de sementes, no crescimento de fungos, além de alelopatia (HARBORNE, 1997).

Tabela 1. Concentração de polifenóis, flavonóides e taninos (mg/g) encontrados no extrato metanólico e na infusão de *E. plana*.

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

¹Fenóis: expresso em ácido gálico (mg/g da amostra); ²Flavonóides: expresso em quercetina(mg/g da amostra); ³Taninos: expresso em catequina (mg/g da amostra).

Os cromatogramas de *E. plana* mostram a presença de ácido gálico ($t_R = 11,41$ min; pico 1), catequina ($t_R = 15,27$ min; pico 2), ácido clorogênico ($t_R = 22,09$ min; pico 3), ácido cafeico ($t_R = 25,03$ min; pico 4), ácido elágico ($t_R = 29,87$ min; pico 5), epicatequina ($t_R = 33,59$ min; pico 6), rutina ($t_R = 41,67$ min; pico 7) e quercetina ($t_R = 50,13$ min; pico 8) (Figura1). A análise por CLAE comprova a presença desses compostos no extrato metanólico e na infusão na planta de *E.plana*.

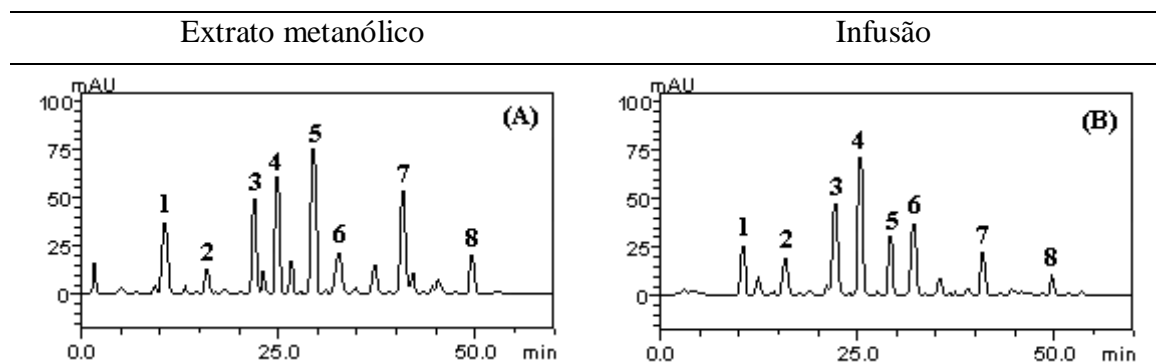


Figura 1. Perfil cromatográfico representativo de *E.plana*, extrato metanólico (A) e infusão (B), detecção UV foi a 327nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7) e quercetina (pico 8).

A tabela 2 apresenta a quantificação de alguns compostos encontrados nas plantas de capim-anoni-2. Considerando o extrato metanólico, o ácido elágico foi o composto que apresentou maior concentração (34,05mg/g), seguido pelo ácido cafeico (31,17mg/g), rutina (29,84mg/g), ácido clorogênico (29,30 mg/g) e ácido gálico (21,53mg/g). A catequina foi a substância em menor concentração neste extrato (8,16mg/g).

Já para a infusão, observa-se uma maior extração de ácido cafeico (33,15mg/g), seguido por ácido clorogênico (28,21mg/g) e epicatequina (20,71 mg/g).

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

Souza Filho et al. (2006) mostram que o efeito do potencial alelopático do ácido gálico sobre a germinação de sementes da planta daninha *Mimosa pudica* (malícia), tem efeito significativo na germinação, com 71% de inibição. Já Lofredo et al. (2005) citam que o ácido cafeico tem efeito alelopático e inibi a germinação e crescimento de sementes de tomate. Golisz et al. (2007), relatam que a rutina tem uma alta atividade alelopática sobre raízes de alface.

Tabela 2. Compostos presentes em extrato metanólico e infusão de *E. plana*, pertencentes a fenóis, flavonóides e taninos.

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

*médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A figura 2 apresenta a atividade antioxidante do extrato metanólico e da infusão de capim-annoni-2. Observa-se que o extrato metanólico seguiu o mesmo comportamento do ácido ascórbico (substância usada com padrão), apresentando um aumento da atividade antioxidante até a concentração de 70µg/ml, estabilizando após estar em 80% de atividade antioxidante, aproximadamente. Já para a infusão, ocorreu um rápido aumento inicial, próximo a 20µg/ml, estabilizando em torno de 60% de atividade antioxidante. Assim, observa-se que o extrato metanólico apresentou um maior percentual de atividade antioxidante quando comparado a infusão, ficando próximo ao padrão.

Os antioxidantes naturais são responsáveis por atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. Estudos recentes mostram que vários extratos de plantas exercem ação antioxidante. A partir da perspectiva do valor potencial dos antioxidantes, as pesquisas buscam extratos e substâncias naturais com potente atividade antioxidante e baixa citotoxicidade (ANDRADE et al., 2007).

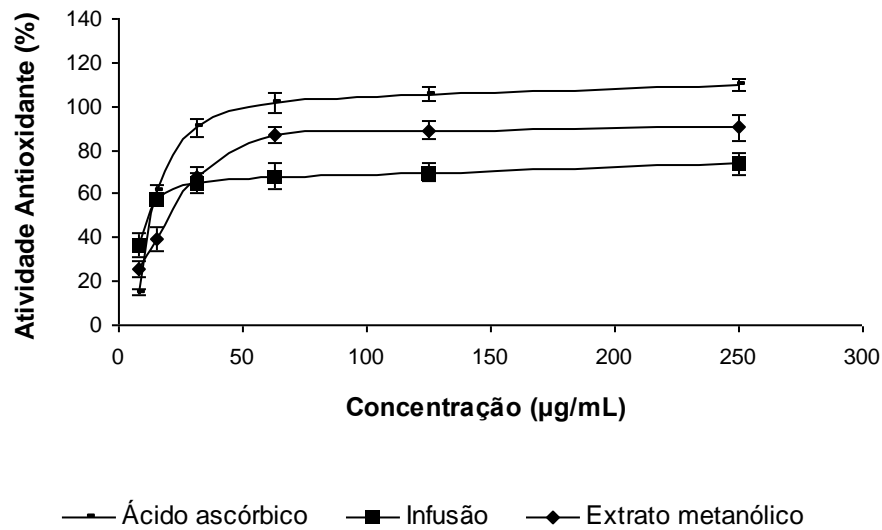


Figura 2. Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), do extrato metanólico e da infusão da planta de *E. plana*, avaliada pelo método do DPPH.

Alguns estudos descrevem que a presença de compostos fenólicos está diretamente relacionada com a atividade alelopática, a qual pode inibir o crescimento e até mesmo a germinação de outras espécies pertencentes ao mesmo ambiente, sendo assim, esse seja possivelmente o motivo pelo qual o capim-annoni-2 é considerado uma planta invasora e dominante, principalmente por apresentar alguns compostos considerados alelopáticos.

Poucos ou inexistentes são os estudos que quantificam os compostos alelopáticos em plantas de *E. plana*. Então, novas pesquisas devem ser desenvolvidas para mensurar e quantificar esses compostos, isso pelo fato de que a área invadida por essa planta no Estado do RS é de aproximadamente um milhão de hectares. Pesquisas são necessárias para que o *E. plana* não domine toda a comunidade campestre e/ou destrua a grande diversidade existente nos campos nativos do RS, os quais fazem parte do Bioma Pampa.

6. CONCLUSÃO

Extrato metanólico de capim-annoni-2 apresentou maior extração dos compostos químicos quando comparado com a infusão.

Os componentes majoritários presentes no extrato metanólico foram: ácido elágico, ácido cafeico, ácido clorogênico e para a rutina. Já na infusão, houve maior extração para o ácido cafeico, ácido clorogênico e para a epicatequina.

A espécie apresentou uma boa atividade antioxidante, sendo a superior no extrato metanólico (em torno de 80%) quando comparado à infusão (em torno de 60%).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAYA, A. L. **Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems.** *Critical Reviews in Plant Sciences*, Apopka, v. 18, n. 6, p. 697-739, 1999.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. **Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acaciapodalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae.** *Revista Brasileira Farmacogn* 17. p. 231-235. 2007.

BOLIGON, A. A., PEREIRA, R. P., FELTRIN, A. C., MACHADO, M. M., JANOVÍK, V., ROCHA, J. B. T., ATHAYDE, M. L. **Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss.** *Bioresource Technology* 100, 6592-6598. 2009.

BRUNING, G.; MEDEIROS, R. B.; CARLOTTO, S. B.; MELLO, F. A.; AZEVEDO, E. B. **Produção Animal em Campo Nativo Dominado por Capim-Annoni-2 em Função de Suplementação.** In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL, 21., Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas: EMBRPA Clima Temperado, 2006. 1 CD-ROM.

COELHO, R. W. **Capim Annoni2, uma Invasora a Ser Controlada: Informações Disponíveis.** In: JORNADA TÉCNICA DO BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., 1983, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMATER-RS; Bagé: EMBRAPA-UEPAE Bagé, p. 51-70. 1983.

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*, v. 20, p. 921-928. 2001.

EINHELLIG, F. A. **Mechanisms and modes of action of allelochemicals.** In: PUTNAM, A. R.; TANG, C.-S. (Eds). **The science of allelopathy.** New York: John Wiley & Sons, p. 171-187. 1986.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. **Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana* 9(2): p. 135 - 141, 2001.**

FERREIRA, N. R., MEDEIROS, R. B., SOARES, G. L. G. **Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais.** *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 30. n° 2, p. 043-059, 2008.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. R.; SOARES, G. L. G. **Avaliação alelopática de capim-annoni-2 sobre a germinação de sementes de gramíneas perenes.** In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL, 21., 2006, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2006. 1 CD-ROM.

FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; CHRIST, E. **Accumulation of flavonols in yellowing beech leaves from forest decline sites.** *TreePhysiol.* 14,p. 403-412. 1994.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochiaesperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanussativus* L.** *Acta BotanicaBrasilica*, São Paulo, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GOLISZ, A.; LATA, B.; GAWRONSKI, S.W.; FUJII, Y. **Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat.** *Weed Biology and Management*, v.7, p.164–171, 2007.

GONZAGA, S. S.; SOUZA, R. O. de. Estratégias para o controle de Capim Annoni-2 na região da campanha do Rio grande do Sul. Bagé, **EMBRAPA – CPPSUL**, p. 1-3. (EMBRAPA-CPPSUL. Comunicado técnico, 23). 1999.

HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Product Reports Articles**, 14: p. 83-98. 1997.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

KAMDEM, J. P.; STEFANELLO, S. T.; BOLIGON, A. A.; WAGNER, C.; KADE, I. J.; PEREIRA, R. P.; PRESTE, A. S.; ROOS, D. H.; WACZUK, E. P.; APPEL, A. S.; ATHAYDE, M. L., SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. In **vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss.** *Acta Pharm.* 62 p. 371-382. 2012.

KIRMAN, K. P.; MORRIS, C. D. **Ecology and dynamics of *Eragrostis curvula* and *E. Plana* with to controlling their spread in natural grassland.** In: INTERNATIONAL RANGELAND CONGRESS, 7., 2003, Durban. **Anais...** Durban: South Africa, 2003.

LOFFREDO, E. ; MONACI, L ; SENESI, N. Humic substances can modulate the allelopathic potential of caffeic, ferulic, and salicylic acids for seedlings of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9424-9430, 2005.

MACIEL, M. Invasora Cruza a Fronteira. **Zero Hora**, Porto Alegre, 1º ago. Campo e Lavoura, n. 970. 2003.

MEDEIROS, R. B.; PILLAR, V. P.; REIS, J. C. L. Expansão de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni-2) no Rio Grande do Sul. In: **Reunión Del Grupo Técnico Regional Del Cono Sur En Mejoramiento y Utilización de Los Recursos Forrajeros Del Área Tropical y Subtropical – Grupo Campos**, 20., 2004, Salto, Uruguai. **Memorias...** Salto: UDELAR–Regional Norte; INIA, p. 211-21. 2004.

MEDEIROS, R. B.; SAIBRO, J. C.; FOCHT, T. Invasão de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no bioma Pampa do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, V. D. P; MÜLLER, S. C.;

CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. **Campos Sulinos conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 317-330. 2009.

METCHE, M. Tanins, nature et propriétés, Groupe Polyphénols. Nancy. v.10, p. 11-32, 1980.

MORAES, P. V. D., PANOZZO, L. E., BRANDOLT, R. R., SILVA, M. B. V. **Potencial alelopático de extratos aquosos de mourisco (*Fogopyrum esculentum* Moench) na germinação e crescimento inicial de plantas daninhas**. In: Revista Tropicana – Ciências Agrárias e Biológicas. v. 4, n. 3, p. 10, 2010.

MORRISON, M., ASIEDU, E. A., STUCHBURY, T., POWELL, A. **A Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats**. *Annals of Botany*. 76: 287-290. 1995.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S. M.; DIÓGENES, F. E. P. **Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferrea* na germinação de alface**. In: Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.8, p.1397-1403, 2012.

REIS, J. C. L. Capim Annoni-2: origem, morfologia, características, disseminação. In: REUNIÃO REGIONAL DE AVALIAÇÃO DE PESQUISA COM ANNONI-2, 1991, Bagé. **Anais...** Bagé: EMBRAPA – CPPSUL, p. 5-53 (EMBRAPA-CPPSUL. Documento,7). 1993.

REIS, J. C. L.; COELHO, R. W. Controle do Capim Annoni-2 em campos naturais e pastagens. Pelotas, **EMBRAPA – CPACT**, 2000. 21 p. (EMBRAPA-CPACT. Circular técnica, 22).

RICE, E. L. **Allelopathy**. London: Academic Press, p 422. 1984.

RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, U.K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. (Eds.) **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall, p.1-10. 1992.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmabobiotecnology. Editora Intenational Williams & Wilkins, Baltimore. 1997.

SCRIVANTI, L. R.; ZUNNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. *Tagetes minuta* and *Schinus molle* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 563-572. 2003.

SHIRLEY, B. W. Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science*, London, v. 31, p. 377-382, 1996.

SILVA, Z. L. **Alelopatia e defesa em plantas**. Boletim Geográfico, Rio de Janeiro, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.

SMITH, A. E. The potential alleiopathic characteristics of bitter sneezeweed (*Ifelenium amarum*). **Weed Science**, v.37, p.665-669, 1989.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. **POTENCIAL**

LELOPÁTICO DE *Myrciaguianensis*. In: Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R.; SCOLFORO, J. R. S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens*(Mart.)Coville] em 10 locais de Minas Gerais. **CiênciaPrática**, v. 14, n. 2, p. 229 – 232, 1990.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control**. *Journal of Apicultural Research*, 37: p. 99-105. 1998.

ZUCKER, W.V. 1983, Tannins: does structure determine function? An ecological perspective, **The American Naturalist**, Lancaster, v. 121 n. 3, p. 335-365, 1983.