
ANA CRISTINA ZORATTO

**Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por
Eucalyptus grandis e *Eucalyptus urophylla* no Vale do Rio Doce,
Minas Gerais.**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Arnola Cecília Rietzler

**São Carlos – SP
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Zoratto, Ana Cristina
Z88a Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por
Eucalyptus grandis e *Eucalyptus urophylla* no Vale do rio Doce , Minas Gerais / Ana
Cristina Zoratto ; orientadora Arnola Cecília Rietzler. — São Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração
em Ciências da Engenharia Ambiental) --Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2007.

1. Ecossistemas aquáticos – monitoramento.
2. Avaliação ecotoxicologica. 3. Vale do rio Doce.

*À minha querida mãe, “**Maria Auxiliadora**” (in memoriam),
pelos ensinamentos de vida, amor e fé.*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

*A **DEUS**, pela sabedoria e por iluminar os meus caminhos.*

À Prof^a. Dr^a. Arnola Cecília Rietzler pela orientação, estímulo e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Lucienir P. Duarte do Laboratório de Fitoquímica – UFMG, pelos ensinamentos, carinho e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Cnpq, pela concessão de bolsa de estudo durante o período de vigência do mestrado.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada - CRHEA – EESC/ USP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental - PPG-SEA.

A Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, pela disponibilidade dos Laboratórios de Fitoquímica do Departamento de Química e de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Geral, onde foram realizados extrações e testes.

A minha família, pelo convívio, carinho, afeto e ajuda direta ou indiretamente em todas as etapas de minha vida.

Ao Marcelo Carlos Costa pela ajuda com as figuras, gráficos e principalmente pela amizade, carinho e apoio incondicional nos momentos finais deste trabalho.

Ao Adriano Silva pela sua compreensão e apoio no início deste trabalho.

Aos amigos e colaboradores Anjaina, Bianca, Prof^a Dr^a Cassiana, Gilberto, Josiane, Natália, Thais e em especial a minha querida amiga e companheira de todas as horas Ádria Caloto de Oliveira e família Caloto obrigada pela amizade, carinho e acolhida em momentos difíceis na condução deste trabalho.

OBRIGADA!

Resumo

ZORATTO, A.C. (2007). AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR *EUCALYPTUS GRANDIS* E *EUCALYPTUS UROPHYLLA* NO VALE DO RIO DOCE, MINAS GERAIS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO CARLOS, 2007.

Tendo como base o escasso conhecimento dos efeitos causados por eucaliptos sobre a biota aquática e o intenso plantio em áreas de entorno de inúmeros lagos no Vale do rio Doce, o presente estudo avaliou a extração, identificação e os efeitos tóxicos dos compostos naturais presentes nas folhas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* das áreas de entorno das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente, através de destilação por arraste a vapor de água, cromatografia gasosa de alta resolução (CGC), análise por infravermelho e testes ecotoxicológicos com as águas de decomposição das folhas (laboratório), com os óleos essenciais, extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas da serapilheira, 30 e 60 dias após contato com as lagoas. Nos testes de toxicidade foram utilizados organismos zooplanctônicos (*Daphnia similis*, *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*) e bentônicos (*Chironomus xanthus*). As folhas de *E. grandis* apresentaram maior rendimento de óleo essencial que as de *E. urophylla*, tendo sido identificado maior número de substâncias nas folhas de *E. urophylla*. No caso dos extratos o *E. grandis* apresentou maior rendimento dos extratos hexânicos, tanto na primeira como na segunda etapa de extração enquanto o *E. urophylla* apresentou maior rendimento de extrato etanólico. Verificou-se como principais compostos nos extratos de *E. urophylla* esteróides e triterpenos. Os resultados dos testes de toxicidade aguda realizados com a água de decomposição das duas espécies de eucaliptos mostraram efeito tóxico a *Daphnia similis*, *D. laevis* e *C. silvestrii* e *Chironomus xanthus* o qual, entretanto, diminuiu com o aumento do tempo de decomposição. Os óleos essenciais apresentaram efeito tóxico em todos os testes realizados com cladóceros (folhas da serapilheira, 30 e 60 dias), assim como os extratos hidroalcoólicos (menos polares) a *Chironomus xanthus* e aquosos (mais polares) à

D. similis e *D. laevis*. verificou-se, portanto, no presente estudo, que os compostos naturais presentes nas folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* podem afetar a biota aquática, sendo importante o monitoramento de ambientes aquáticos circundados por monoculturas de *Eucalyptus* spp.

Palavras-Chave: Avaliação ecotoxicológica; lagoas naturais; Vale do rio Doce, MG; *Eucalyptus* spp; compostos naturais.

ABSTRACT

ZORATTO (2007). Ecotoxicological evaluation of natural compounds produced by *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* in the Valley of Rio Doce, Minas Gerais State. Dissertação (Mestrado) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2007.

Based on the scarce knowledge of the effect caused by eucalyptus on aquatic biota and the intense plantation in the surroundings of innumerable lakes in the Valley of Rio Doce, the present study evaluated extraction, identification and toxic effect of natural compounds found in leaves of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* nearby Palmeirinha and Ferruginha lagoons, respectively, through vapor dragging distillation, High resolution gas chromatography (HRGC), Infrared spectroscopy (IR) and ecotoxicological tests with leaves decomposition water (laboratory), essential oils, hydroalcoholic and aqueous extracts of litter leaves, and after 30 and 60 days in contact with the lagoons. For the toxicity tests, zooplanktonic (*Daphnia similis*, *Daphnia laevis* and *Ceriodaphnia silvestrii*) and benthic (*Chironomus xanthus*) organisms were used. The leaves of *E. grandis* showed higher outcome of essential oils compared to *E. urophylla*, being identified a higher number of substances in *E. urophylla* leaves. In the case of extracts, *E. grandis* showed higher outcome of hexanic extracts in the first and second steps of extractions, while *E. urophylla* presented higher outcome of ethanolic extracts. The main compounds found in *E. urophylla* extracts were steroids and triterpenes, and in *E. grandis* were saponins, steroids and triterpenes. The results of the acute ecotoxicological tests carried out with decomposition water of both eucalyptus species showed toxic effect to *Daphnia similis*, *D. laevis*, *C. silvestrii* and *Chironomus xanthus*, which, however, decreased with decomposition time. The essential oils, showed toxic effect in all tests performed with cladocerans (litter leaves, 30 and 60 days), as well as the hydroalcoholic extracts to *Chironomus xanthus* and aqueous to *D. similis* and *D. laevis*. Thus, it was verified, in the present study, that the natural compounds found in *E. grandis* and *E. urophylla* leaves can affect the aquatic biota, being important the monitoring of aquatic environments surrounded by *Eucalyptus* monocultures.

Key-words: Ecotoxicological evaluation; natural lagoons; Rio Doce Valley, Minas Gerais; *Eucalyptus* spp; natural compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Floresta de <i>Eucalyptus</i> spp.....	11
Figura 2 - <i>Eucalyptus urophylla</i> (a) e <i>Eucalyptus grandis</i> (b).....	14
Figura 3 - <i>Daphnia similis</i>	18
Figura 4 - <i>Ceriodaphnia</i> spp.	19
Figura 5 - <i>Chironomus xanthus</i>	21
Figura 6 - Localização do Parque Estadual do Rio Doce.....	23
Figura 7 - Delimitação político-administrativa do Vale do Rio Doce.....	24
Figura 8 - Bacia do rio Doce e seus principais afluentes no entorno do Parque Estadual do Rio Doce (PERD).....	26
Figura 9 - Áreas de plantio de <i>Eucalyptus grandis</i> (a) e a camada de serapilheira de <i>Eucalyptus urophylla</i> (b).....	28
Figura 10 - Lagoa Palmeirinha, circundada por plantações de <i>Eucalyptus grandis</i>	29
Figura 11 - Lagoa Ferruginha, circundada por plantações de <i>Eucalyptus urophylla</i>	31
Figura 12 - Etapas de decomposição de detritos foliares.....	37
Figura 13 - Cultivos de <i>Daphnia</i> spp e <i>Ceriodaphnia</i> spp mantidos em câmara incubadora e manuseio das culturas.....	43
Figura 14 - Etapas do cultivo de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Ágar inclinado (a) e inóculo (b).....	44
Figura 15 - Cultivo de <i>Chironomus xanthus</i> . gaiolas de naylon (a) e bandejas mantidas sob aeração (b).....	45
Figura 16 - Diferenças na coloração da água nos experimentos de decomposição utilizando <i>E. grandis</i> (a) nas concentrações 100, 50 e 25% e <i>E. urophylla</i> (b) nas mesmas concentrações.....	49
Figura 17 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da primeira decomposição das folhas de <i>E. grandis</i> em laboratório.....	51
Figura 18 - Imobilidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da primeira decomposição das folhas de <i>E. urophylla</i> em laboratório.....	52
Figura 19 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da segunda decomposição das folhas de <i>E. grandis</i> em laboratório.....	53
Figura 20 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da segunda decomposição das folhas de <i>E. urophylla</i> em laboratório.....	54
Figura 21 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da terceira decomposição das folhas de <i>E. grandis</i> em laboratório.....	55
Figura 22 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da terceira decomposição das folhas de <i>E. urophylla</i> em laboratório.....	56

Figura 23 - Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da quarta decomposição das folhas de <i>E. grandis</i> em laboratório.....	57
Figura 24 - Pesagem das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i> (a) e <i>litter-bags</i> prontos para serem colocados nas lagoas (b).....	67
Figura 25 - Sistema Clevenger para extração de óleo essencial.....	68
Figura 26 - Destilação de folhas de <i>Eucalyptus</i> - Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG.....	68
Figura 27 - Fluxograma das etapas de extração do óleo essencial de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	69
Figura 28 - Extração de óleo essencial (Sistema Clevenger) (a) e detalhe da camada de óleo na coluna (b), no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG.....	71
Figura 29 - Funil de separação (a) e destilação em Evaporador Rotatório (b), para remoção do solvente, realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG.....	71
Figura 30 - Técnica de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.....	73
Figura 31 - Porcentagem (%) de óleos essenciais extraídos das folhas de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente.....	76
Figura 32 - Porcentagem (%) de óleos essenciais extraídos das folhas de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente.....	77
Figura 33 - Cromatogramas dos óleos essenciais de <i>E. grandis</i> : (a) Folhas Secas-Serapilheira; (b) Folhas Secas - 30dias e (c) Folhas Secas - 60dias.....	78
Figura 34 - Cromatogramas dos óleos essenciais de <i>E. urophylla</i> : (a) Folhas Secas-Serapilheira; (b) Folhas Secas - 30dias e (c) Folhas Secas - 60dias.....	79
Figura 35 - Valores de CE50 ($\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) para os testes realizados com óleo essencial das folhas de <i>E. grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Palmeirinha utilizando <i>D. similis</i> e <i>D. laevis</i> , na primeira (a) e segunda etapa (b) de extração.....	83
Figura 36 - Valores de CE50 ($\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) para os testes realizados com óleo essencial das folhas de <i>E. urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Ferruginha utilizando <i>D. similis</i> e <i>D. laevis</i> , na primeira (a) e segunda etapa (b) de extração.....	85
Figura 37 - Metodologia utilizada nas etapas de extração de extratos das folhas de <i>Eucalyptus</i> spp.....	98
Figura 38 - Extração exaustiva – aparelho Soxhlet.....	99

Figura 39 - Carta simplificada das frequências características dos grupos funcionais mais comuns. S=forte, w=fraca, m=média, sh=aguda, br=larga, alkenes=alquenos (insaturação), alkynes=alquinos, aromatics=aromáticos.....	102
Figura 40 - Variação na quantidade de extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Palmeirinha, entre outubro e dezembro de 2005.....	108
Figura 41 - Variação na quantidade de extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Palmeirinha entre maio e julho de 2006.....	112
Figura 42 - Variação na quantidade de extratos das folhas de <i>Eucalyptus urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Ferruginha, entre outubro e dezembro de 2005.....	116
Figura 43 - Variação na quantidade de extratos das folhas de <i>Eucalyptus urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Ferruginha, entre maio e julho de 2006.....	119
Figura 44 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato hexânico das folhas de <i>E. grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando <i>Chironomus xanthus</i> : (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.....	126
Figura 45 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato hexânico das folhas de <i>E. urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando <i>Chironomus xanthus</i> : (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.....	127
Figura 46 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato em acetato de etila das folhas de <i>E. grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando <i>Chironomus xanthus</i> : (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.....	130
Figura 47 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato em acetato de etila das folhas de <i>E. urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando <i>Chironomus xanthus</i> : (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.....	131
Figura 48 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato etanólico das folhas de <i>E. grandis</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando <i>Daphnia similis</i> e <i>Daphnia laevis</i> : (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.....	133

-
- Figura 49 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato etanólico das folhas de *E. urphylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração..... 135
- Figura 50 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração..... 137
- Figura 51 - Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração..... 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontrados na lagoa Palmeirinha em 2005.....	30
Tabela 2	–Valores de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontrados na lagoa Ferruginha em outubro de 2006.....	30
Tabela 3	– Decomposição em função do período (dias).....	42
Tabela 4	– Massa (g) de folhas utilizadas na extração do óleo essencial de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> em função do tempo – primeira etapa de extração.....	70
Tabela 5	– Massa (g) de folhas utilizadas na extração do óleo essencial de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> em função do tempo – segunda etapa de extração.....	70
Tabela 6	– Rendimento (%) dos óleos essenciais de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	75
Tabela 7	– Rendimento (%) dos óleos essenciais de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	76
Tabela 8	– Substâncias identificadas nos óleos essenciais de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	81
Tabela 9	– Solventes utilizados para a dissolução de cada extrato.....	104
Tabela 10	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de <i>E. grandis</i>	105
Tabela 11	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas <i>E. grandis</i> após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.....	106
Tabela 12	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídas das folhas <i>E. grandis</i> após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.....	107
Tabela 13	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de <i>E. Grandis</i>	109
Tabela 14	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E. grandis</i> , após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.....	110
Tabela 15	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E. grandis</i> após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.....	111
Tabela 16	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de <i>E. urophylla</i>	113
Tabela 17	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E. urophylla</i> após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha.....	114

Tabela 18	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E.urophylla</i> após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha.....	115
Tabela 19	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de <i>E. urophylla</i>	116
Tabela 20	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E. urophylla</i> após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha.....	117
Tabela 21	– Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de <i>E. urophylla</i> após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha.....	118
Tabela 22	– Classes metabólicas identificadas nos extratos das folhas de <i>Eucalyptus urophylla</i> da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Ferruginha.....	120
Tabela 23	– Classes metabólicas identificadas nos extratos das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> da serapilheira, 30 e 60 dias de após contato com a lagoa Palmeirinha.....	121
Tabela 24	– Algumas absorções observadas nos espectros dos extratos de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	124

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1 – INTRODUÇÃO.....	02
2 – OBJETIVOS GERAIS.....	05
3 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	06
3.1 – Recursos hídricos.....	06
3.2 – Sistemas florestais de eucaliptos e suas implicações em bacias hidrográficas.....	08
3.3 – <i>Eucalyptus</i> spp.....	09
3.3.1 – Introdução de <i>Eucalyptus</i> spp no Brasil.....	10
3.3.2 – Impactos causados pelo <i>Eucalyptus</i>	12
3.3.3 – <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	13
3.4 – Conceitos e princípios da ecotoxicologia.....	14
3.4.1 – Testes de toxicidade.....	15
3.4.2 – Organismos-Teste.....	17
3.4.2.1 – <i>Daphnia</i> spp.....	17
3.4.2.2 – <i>Ceriodaphnia</i> spp.....	19
3.4.2.3 – <i>Chironomus</i> spp.....	20
4 – ÁREA DE ESTUDO.....	23
4.1 - Lagoa Palmeirinha e lagoa Ferruginha.....	28
CAPITULO I.....	32
1 – INTRODUÇÃO.....	33
1.1 – Vegetação e recursos hídricos.....	33
1.2 – Formação de serapilheira.....	35
1.3 – Decomposição e liberação de nutrientes e outras substâncias da serapilheira.....	36
2 – OBJETIVOS.....	41
3 – MATERIAIS E METODOS.....	42
3.1 – Amostragem.....	42
3.2 – Decomposição em laboratório.....	42
3.3 – Condições de cultivo.....	42
3.4 – Água de cultivo e testes de sensibilidade.....	43
3.5 – Testes de toxicidade.....	45
3.6 – Monitoramento de variáveis químicas nos testes de toxicidade.....	46
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
4.1 – Diferenças visuais observadas nas águas de decomposição das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	48

4.2 – Testes de toxicidade após 4 dias de decomposição das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	48
4.3 – Testes de toxicidade após 7 dias de decomposição das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	50
4.4 – Testes de toxicidade após 15 dias de decomposição das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	52
4.5 – Testes de toxicidade após 34 dias de decomposição das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	54
4.6 – Validade dos Testes.....	57
5 – CONCLUSÕES	59
	60
CAPITULO II	61
1 – INTRODUÇÃO	62
1.1 – Óleos essenciais.....	62
2 – OBJETIVOS	65
3 – MATERIAIS E METODOS	66
3.1 – Período e frequência de amostragem.....	66
3.2 – Preparo dos <i>litter-bags</i> para manutenção nas lagoas.....	66
3.3 – Extração dos óleos essenciais.....	67
3.3.1 – Etapas da extração do óleo essencial.....	69
3.3.2 – Rendimento dos óleos essenciais.....	72
3.4 – Identificação dos componentes dos óleos essenciais.....	72
3.5 – Testes de toxicidade.....	74
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 – Rendimento dos óleos essenciais.....	75
4.2 – Primeira etapa de extração.....	75
4.3 – Segunda etapa de extração.....	76
4.4 – Análise dos óleos essenciais de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	77
4.5 – Testes de toxicidade.....	81
4.5.1 – <i>Eucalyptus grandis</i>	81
4.5.2 – <i>Eucalyptus urophylla</i>	83
5 – CONCLUSÕES	86
CAPITULO III	88
1 – INTRODUÇÃO	89
1.1 – Polaridade da molécula.....	92
1.2 – Substâncias polares.....	92
1.3 – Substância não-polar ou apolar.....	92
1.4 – Solubilidade das substâncias.....	93
1.5 – Contaminação de sedimento.....	94
2 – OBJETIVOS	95
3 – MATERIAIS E METODOS	96
3.1 – Período e frequência de amostragem.....	96
3.2 – Extração.....	96

3.2.1 – Etapas da extração dos extratos.....	97
3.3 – Rendimento dos extratos hidroalcolicos e dos extratos aquosos.....	99
3.4 – Identificação dos compostos dos extratos hidroalcolicos e dos extratos aquosos.....	100
3.4.1 – Classes de substâncias identificadas nos extratos dos <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	100
3.4.2 – Testes químicos.....	100
3.4.3 – Espectroscopia no infravermelho.....	101
3.5 – Testes de Toxicidade.....	102
3.5.1 - Preparo das soluções para os testes de toxicidade com os extratos mais polares utilizando <i>D.similis</i> e <i>D. laevis</i>	103
3.5.2 – Preparo dos sedimentos para os testes de toxicidade com <i>Chironomus xanthus</i>	103
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	105
4.1 – Rendimento dos extratos.....	105
4.1.1 – Primeira etapa de extração de <i>Eucalyptus grandis</i>	105
4.1.2 – Segunda etapa de extração de <i>Eucalyptus grandis</i>	109
4.1.3 – Primeira etapa de extração de <i>Eucalyptus urophylla</i>	112
4.1.4 – Segunda etapa de extração de <i>Eucalyptus urophylla</i>	116
4.2 – Testes químicos.....	119
4.3 - Espectros no Infravermelho.....	123
4.4 – Resultados dos testes de toxicidade.....	125
4.4.1 – Extrato hexânico.....	125
4.4.2 – Extrato em clorofórmio.....	128
4.4.3 – Extrato em acetato de etila.....	129
4.4.4 – Extrato etanólico.....	132
4.4.5 – Extrato aquoso.....	136
4.6 – Validade dos testes.....	139
5 – CONCLUSÕES.....	140
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	143
ANEXO.....	158

INTRODUÇÃO GERAL

“Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* no Vale do rio Doce, Minas Gerais”.

1 – INTRODUÇÃO

As massas continentais de água doce representam uma porção muito pequena do total do componente hídrico do planeta. Segundo Rebouças (1999), essa fração é de apenas 1,2% do total, quando são consideradas apenas as águas superficiais disponíveis para o uso imediato pelo homem, excluindo-se aquelas que se encontram congeladas na superfície da crosta terrestre e no interior dos solos “permafrost”, e aquelas que já sofreram fortes impactos antropogênicos.

Tundisi (1999), afirma que o desenvolvimento de um país, nos campos social e econômico, está baseado na disponibilidade hídrica de boa qualidade, e na capacidade de proteção e conservação deste elemento natural. Entretanto, segundo o autor, em todos os continentes os recursos hídricos superficiais e subterrâneos têm sido deteriorados devido às múltiplas atividades humanas desenvolvidas com grande intensidade nas bacias hidrográficas do planeta. Os processos de industrialização e de urbanização têm tornado cada vez mais crítica a questão da contaminação do meio ambiente, alterando tanto a quantidade como a qualidade de água.

Nos países em desenvolvimento, a degradação ambiental vem sendo agravada pelo crescimento explosivo da população humana envolvendo aspectos sociais, econômicos, culturais e científicos. A deterioração da qualidade das águas doces é uma das principais causas de perda de diversidade, através da extinção das espécies, tornando necessário o aumento de programas de gerenciamento e recuperação de lagos, reservatórios e rios (TUNDISI op. cit).

A constante utilização dos recursos hídricos tem requerido um maior número de estudos para avaliar e manter a sua qualidade. De acordo com Chapman (1989) a avaliação e o monitoramento ambiental podem fornecer importantes informações sobre a extensão do grau de poluição no ambiente e os seus prováveis impactos,

gerando também dados sobre a deterioração ou melhoria ambiental em uma escala temporal, permitindo avaliar a eficiência das ações mitigadoras adotadas. Além de importante para a avaliação do grau de degradação ambiental, estes processos são essenciais para o conhecimento destes ecossistemas.

Como já mencionado anteriormente, diversas atividades humanas podem interferir tanto na qualidade quanto na quantidade de água disponível. Dentre elas, as plantações florestais, que vêm se tornando a cada dia mais importante como fonte de matéria-prima tanto para a produção de celulose como para produção de energia. Neste contexto, as plantações de eucalipto merecem especial atenção (CÂMARA, 1999).

No caso das monoculturas, as alterações na bacia de drenagem e, conseqüentemente, da qualidade da água, são desencadeadas desde o início com a retirada da cobertura vegetal natural que elimina praticamente toda a diversidade biológica da região (BARBIERI et al., 1997).

Considerando-se que uma parcela significativa dos suprimentos energéticos dos corpos d'água derivam de folhas provenientes da área de entorno, mudanças na vegetação ripária têm o potencial de afetar os sistemas aquáticos que delas dependem nutricionalmente (CANHOTO et al., 2002). Dessa forma, a mudança na vegetação original do entorno de lagos com o plantio de eucaliptos, cujas folhas liberam compostos naturais durante a decomposição, podem alterar a qualidade das águas de lagos naturais, afetando a biota aquática (ABELHO, 1996).

Além disso, estes compostos liberados durante a decomposição apresentam efeito alelopático, mesmo em pequenas concentrações, que resultam na inibição da germinação, do crescimento ou do metabolismo de uma planta, contribuindo, dessa forma, para o aumento da competição entre espécies. Uma análise comparativa dos efeitos de compostos fenólicos em folhas de *Eucalyptus globulus* e de *Quercus robur* (carvalho-vermelho) mostrou que o eucalipto geralmente apresenta maior conteúdo desses compostos, embora uma vez no horizonte do solo não se pode mais detectar nenhuma diferença entre as duas espécies, dificultando atribuir o efeito alelopático a uma ou outra espécie (LIMA, 1996).

Por outro lado, existem poucos estudos que relatam o efeito de compostos naturais provenientes das folhas de eucaliptos no ambiente aquático (GRAÇA et al., 2002), particularmente os liberados das folhas da serapilheira.

Tendo como base o escasso conhecimento dos efeitos causados por eucaliptos sobre a biota aquática e o intenso plantio em áreas de entorno de inúmeros lagos no Vale do rio Doce, estudos ecotoxicológicos são fundamentais para a avaliação da qualidade da água e sedimento destes ambientes e sua influência na diversidade de organismos, possibilitando um melhor monitoramento das condições ambientais sujeitas a atividades antrópicas.

Inúmeros estudos já foram realizados nos lagos do Vale do rio Doce, a partir do final da década de 70, incluindo estudos limnológicos em lagos externos e internos ao Parque Estadual do rio Doce. Os estudos nessa região iniciaram-se efetivamente no ano de 1976, após a 1ª Conferência Brasileira sobre Limnologia e Aqüicultura em Belo Horizonte (MG), a partir do estabelecimento de um convênio de cooperação entre Japão e Brasil em 1974 (TUNDISI e SAIJO, 1997).

Entretanto, nenhum dos estudos desenvolvidos teve o enfoque de avaliação ecotoxicológica de substâncias naturais produzidas por duas espécies de eucaliptos (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*). As extensas áreas de plantio de eucaliptos encontradas próximas a diversos lagos e lagoas do sistema lacustre do Vale do rio Doce, possivelmente causem efeitos à biota, como mostraram alguns dados preliminares obtidos em testes de toxicidade com cladóceros (GUIMARÃES, 2004), e que serviram de base para o presente estudo.

2 – OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo avaliou o efeito de duas espécies de eucaliptos (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*) plantadas no entorno das lagoas Palmeirinha e Ferruginha no Sistema Vale do rio Doce, em Minas Gerais, sobre a biota aquática, procurando fornecer subsídios para o monitoramento de ecossistemas aquáticos em áreas de plantio de eucaliptos. Para tanto, foram considerados os seguintes aspectos:

- Análise da influência de substâncias naturais presentes nas folhas secas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* sobre organismos zooplancctônicos (*Daphnia similis*, *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*) e bentônicos (*Chironomus xanthus*), utilizando testes de toxicidade aguda;
- Estimativa do efeito destas espécies de eucaliptos sobre os sistemas aquáticos, a partir dos experimentos com folhas coletadas na área de entorno e de folhas em decomposição nos lagos e no laboratório, com tempo conhecido de exposição;
- Avaliação, através dos testes de toxicidade realizados com diferentes organismos-teste, da adequação das concentrações atuais de fenol na classificação da poluição aquática utilizados por órgãos ambientais no controle da qualidade das águas, de acordo com a Resolução CONAMA 357 (2005).

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Recursos hídricos

O desenvolvimento econômico e social de qualquer país está fundamentado na disponibilidade de água de boa qualidade e na capacidade de conservação e proteção dos recursos hídricos. Uma das causas fundamentais do aumento no consumo de água e da rápida deterioração de sua qualidade é o crescimento da população mundial e da taxa de urbanização. No Brasil, 70% da população vive atualmente em áreas urbanas com necessidades crescentes de água e com aumento permanente nos custos de tratamento devido ao aumento da demanda por água e pela piora na qualidade. A água doce é um recurso limitado, sendo necessária à implementação de medidas de conservação e recuperação dos recursos disponíveis (TUNDISI e BARBOSA, 1995).

Outra importante razão para a preservação e conservação dos recursos hídricos é a grande diversidade biológica da maioria dos ecossistemas aquáticos, principalmente os de água doce. A maior parte da diversidade biológica aquática está distribuída na plataforma continental, em recifes de coral e na água doce, (COHEN, 1970 apud ANDRADE, 2003).

Os ecossistemas de água doce são constituídos principalmente pelas comunidades planctônicas (fitoplâncton e zooplâncton), bentônica (fauna e flora associados ao sedimento), perifítica (algas e animais associados a um substrato orgânico ou mineral), de macrófitas (vegetação aquática macroscópica com importante papel na dinâmica dos nutrientes) e nectônica (representada principalmente pelos peixes e outros vertebrados aquáticos).

Essa biodiversidade aquática, contudo, está seriamente ameaçada. Segundo Moyle e Leidy (1992), as principais causas da perda de diversidade biológica nos ecossistemas aquáticos estão relacionadas à:

- Usos da água através de ações como barramentos, canalização, irrigação, controle de inundação, consumo doméstico e industrial, provocando competição com a biota;

-
- Alterações dos habitats: canalizações, represas e barragens, assoreamento, degradação e perda de áreas alagáveis;
 - Poluição: fontes pontuais e difusas;
 - Introdução de espécies exóticas;
 - Exploração comercial de recursos.

Sendo assim, um dos fatores que garantem a estabilidade dos ecossistemas lacustres são as condições ecológicas da bacia de drenagem, as quais envolvem os aspectos físicos, químicos e biológicos (KIRA e SAZANAMI, 1995).

Neste contexto, a flora e a fauna presentes em um sistema aquático são influenciadas pelo ambiente físico do corpo d'água (geomorfologia, velocidade da corrente, vazão, tipo de substrato, tempo de retenção) e pelas atividades humanas realizadas em seu entorno. O primeiro passo para a compreensão de como as comunidades de macroinvertebrados bentônicos, por exemplo, estão reagindo à alteração da qualidade de água é identificar quais variáveis físicas, químicas e biológicas estão afetando os organismos (TATE e HEINY, 1995).

A caracterização do meio físico da bacia hidrográfica, com o intuito de levantar todas as áreas críticas do ponto de vista da manutenção da água, é condição básica para um planejamento bem sucedido da conservação e produção de água. Entretanto, segundo Pereira (1973), a conservação da água não pode ser conseguida independentemente da conservação dos outros recursos naturais.

Um conjunto de parâmetros físicos, químicos e biológicos exercem influência direta na integridade da bacia hidrográfica que, por sua vez, está ligada a uma série de fatores de origem natural e antrópica que devem ser observados conjuntamente. A integridade da microbacia envolve não só as práticas de conservação de solo como, também, a preservação de matas ciliares, a prevenção de compactação do solo, manutenção da biodiversidade e construção adequada de estradas (LIMA e ZAKIA, 1998).

A qualidade do ambiente aquático é definida por uma série de concentrações, partículas físicas, substâncias orgânicas e inorgânicas, e a composição e estado da biota aquática encontrada num corpo hídrico mostram as variações temporais e

especiais em função dos fatores internos e externos do corpo hídrico (MEYBECK e HELMER, 1992), como, por exemplo, o tipo de cobertura vegetal da bacia (VAZHEMIN, 1972 apud PEREIRA, 1997).

Por outro lado, as águas naturais são os receptores da maioria de substâncias potencialmente tóxicas geradas pelas atividades industriais, agrícolas e domésticas. Embora os ecossistemas aquáticos possam ter uma série de mecanismos físicos, químicos e biológicos para a assimilação dessas substâncias, prevenindo danos à biota, quando estas atingem níveis acima da capacidade assimilativa do corpo receptor, podem afetar a sobrevivência, o crescimento, a reprodução ou o comportamento dos organismos (ANDERSON e D'APOLLONIA, 1978 apud FONSECA, 1997).

3.2 – Sistemas florestais de eucaliptos e suas implicações em bacias hidrográficas

O tipo de vegetação é um dos atributos mais importantes dos sistemas terrestres que podem afetar a composição de organismos e a qualidade da água em corpos lacustres, pela diferença qualitativa e quantitativa na entrada do *“litter”* ou serapilheira e dos nutrientes no corpo lacustre (MORETTO, 2001).

Abelho e Graça (1996) afirmam que corpos d'água que apresentam florestas decíduas naturais no entorno contêm maior diversidade de invertebrados do que aqueles que são constituídos por agroecossistemas, a exemplo das florestas de eucaliptos.

Portanto, as alterações geradas pelo cultivo de monoculturas de eucalipto (vegetação exótica) nos sistemas lacustres atuam inicialmente como distúrbio que pode ser assimilado pelos processos ecológicos ao longo do tempo, com alteração das inter-relações entre os elementos biológicos (diversidade), físicos e químicos, podendo afetar a estabilidade dos lagos (MORETTO, op. cit).

3.3 – *Eucalyptus* spp

De ocorrência natural da Austrália, este gênero possui cerca de 600 espécies adaptadas às diversas condições de clima e solo. Dentro dessa grande diversidade, somente duas espécies não são originárias da Austrália: *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus deglupta* (MOURA e GARCIA, 2000), e que atualmente vem sendo utilizados em programas de reflorestamento homotípico.

Em diversos países essas plantações visam sua utilização em indústrias de celulose, farmacêutica e de produtos de higiene. As espécies de eucalipto apresentam características adequadas para o uso em escala comercial, tais como rápido crescimento, alta produção de celulose e resistência às adversidades das condições ambientais e às doenças (SANTOS et al., 2001). Por essas características, seu uso nos trópicos tem sido altamente favorável. No Brasil, a maior parcela das áreas reflorestadas com eucalipto é formada por solos de baixa fertilidade, que aliados a problemas de déficit hídrico, dificultam a produção de madeira viável economicamente (ANDRADE 1991 apud MARQUES JÚNIOR et al., 1996).

A grande maioria de espécies desse gênero, são conhecidas como árvores típicas de florestas altas, com 30 a 50 m de altura e com florestas abertas, com árvores de 10 a 25 m de altura. Aproximadamente, 30 a 40 espécies são arbustivas (MOURA e GARCIA op. cit). Situadas na faixa compreendida entre as latitudes 9°N e 44°S, encontram amplamente espalhadas na natureza em altitudes que variam de 30 a 100 m (ELDRIDGE et al., 1994).

A madeira dessas espécies é na maioria das vezes dura, pesada, resistente, com textura fina e baixa estabilidade dimensional (RECORD e HESS, 1949). O gênero *Eucalyptus* é representado por árvores com alta taxa de crescimento, plasticidade, desrama natural e madeira com variações nas propriedades tecnológicas, adaptadas às mais variadas condições de uso.

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de eucalipto, e sua destinação serve basicamente à produção de celulose e papel e ao carvão que abastece as siderúrgicas, gerando um grande número de empregos diretos e indiretos. Entre as centenas de espécies do gênero *Eucalyptus*, cerca de trinta têm

mostrado potencial para o cultivo de alta produtividade. Entretanto, estima-se que apenas dez espécies são exploradas na plantação mundial ocupada pela cultura de eucalipto (MOURA e GARCIA, 2000).

3.3.1 – Introdução de *Eucalyptus* spp no Brasil

No Brasil, o *Eucalyptus* foi introduzido por D. Pedro I, em 1825, com o plantio de mudas das espécies *robusta* e *tereticornis* no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (MOURA et al., 1980).

Até o princípio do século XX, o eucalipto foi plantado apenas como árvore decorativa, como quebra-ventos, pelo seu extraordinário desenvolvimento ou por supostas propriedades sanitárias. A introdução da cultura econômica de eucaliptos teve início pela Companhia Paulista de Estradas de Ferro, para serem usados como dormentes, postes e lenhas, a partir do trabalho realizado pelo grande silvicultor brasileiro Edmundo Navarro de Andrade (SAMPAIO, 1957).

Na década de 1950, começou-se a cogitar sobre o uso do eucalipto como matéria-prima para produção de celulose e chapas. Nessa época, a atividade florestal brasileira passou a mostrar contornos mais definidos e a exigir estudos visando aumentar a produtividade e a melhorar a qualidade da matéria-prima (BARRICHELO, 1995).

Assim, o reflorestamento em larga escala no Brasil iniciou-se apenas na década de 60 do século XX, quando foi sancionada a Lei nº 5.106, de 1966, com os incentivos fiscais recolhidos ao Fundo de Investimento Setorial – Fiset Reflorestamento e aplicados mediante a aprovação de projetos apresentados ao então Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal – IBDF. A partir daí, a área plantada – em sua grande maioria, com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* chegou a atingir, em 1983, 5,3 milhões de hectares, tendo sido empregados cerca de US\$ 2,7 bilhões, resultando na geração de 400 mil empregos diretos (VIANA, 2004).

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente – MMA, com base na destinação dos produtos indicada nos projetos, foi esta a distribuição das áreas reflorestadas por setor, em milhões de hectares: siderurgia e carvão vegetal: 1,64

(31%); papel e celulose: 1,60 (30%); madeira processada mecanicamente: 0,85 (16%); frutíferas e palmáceas: 0,60 (11%); outros fins: 0,61 (12%).

Atualmente, o Brasil possui pouco menos de cinco milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto (Figura 1), grande parte dos quais em Minas Gerais. Segundo dados da Associação Mineira de Silvicultura – AMS, estima-se que esse Estado, que chegou a ter mais de dois milhões de hectares de reflorestamentos em décadas anteriores, possua, hoje, cerca de 1,5 milhão de hectares, principalmente de eucalipto. Seu consumo anual é de 120 mil hectares, quase o dobro do plantio de florestas em 2002/2003, que foi de 68 mil hectares.



Figura 1 – Floresta de *Eucalyptus* spp.

Fonte: (causa-nossa.blogspot.com/.../petrleo-verde.html). Acesso: 15 de junho de 2007.

Com isso, as plantações de eucaliptos em grandes extensões territoriais têm sido alvo de caloroso debate, que está longe de ser consensual, ainda mais quando se inclui a questão ambiental como central e imprescindível para o desenvolvimento sustentável. Recentemente, esta questão voltou a ser discutida com os novos mega projetos de plantação de eucalipto no sul da Bahia, Espírito Santo e norte fluminense para o abastecimento da indústria de celulose.

A reação e a mobilização dos ambientalistas vem sendo forte, principalmente no que tange aos projetos de reflorestamento que não contenham compensação de plantio de essências nativas (VIANA, op. cit).

Com essa mobilização, surgiram várias iniciativas nos governos municipais e estaduais, bem como no Congresso Nacional, proibindo o plantio extensivo de eucalipto, principalmente para a produção de celulose, bem como das áreas que podem ou não ser utilizadas para essa finalidade.

No estado de Minas Gerais, o eucalipto tem sido apontado como principal motivo da desertificação do Vale do Jequitinhonha – MG, onde até a década de 1990, o programa federal de incentivos fiscais, foi bastante utilizado para projetos de reflorestamento, com supressão de vegetação nativa, conversão de terras agricultáveis em áreas reflorestadas homogeneamente. Em verdade, a expansão do reflorestamento baseou-se na incorporação de terras ao sistema produtivo, terras essas que não eram áreas marginais, resultando numa significativa concentração de latifúndios (CHAVES, 2003).

Segundo Rogick (1996), depoimentos chamam a atenção para os impactos produzidos pela monocultura de eucalipto em outros dois ambientes distintos de Minas Gerais, o cerrado do centro-norte do Estado e a região de Mata Atlântica da bacia do rio Piracicaba, afluente do rio Doce.

O plantio de *Eucalyptus* spp. (Myrtales, Myrtaceae) ocupa grandes áreas do Estado de Minas Gerais. A partir do momento que se reconheceu o valor de sua madeira, houve a preocupação de explorar mais racionalmente as áreas plantadas, enquanto os problemas ligados à preservação do ambiente e as conseqüências do plantio somente foram enfocados mais tarde (GOLFARI, 1975; LIMA, 1993), visto que muitos impactos sobre a biodiversidade têm sido detectados (PAULA, 1997; PECK et al., 1998; LOUZADA et al., 2000; ANDERSEN et al., 2002).

3.3.2 – Impactos causados pelo *Eucalyptus*

Eucaliptos dispõem da resistência elevada contra secas e da capacidade de rebrotação depois de queimadas. Os benefícios de eucaliptos são vários: a utilização industrial da madeira, por exemplo, para a produção de papel, construção civil, indústria farmacêutica e a utilização das estacas e dos materiais combustíveis pelas comunidades locais (LAMPRECHT, 1989).

Apesar de possuir todos os benefícios mencionados anteriormente, não existe um outro gênero de árvore mais controverso do que o *Eucalyptus*. Segundo Evans (1992), alguns países limitaram ou mesmo proibiram o estabelecimento de árvores desse gênero por causa dos impactos ambientais negativos.

Segundo Barbieri (1997), os principais efeitos da atividade de monocultura do eucalipto referem-se ao grande consumo de água e nutrientes, alterações nas propriedades do solo que podem ocasionar erosão, eventuais efeitos alelopáticos próprios da vegetação de eucaliptos sobre outras espécies vegetais, e quando em contato com o meio ambiente, podem propiciar caráter de toxicidade, trazendo sérios prejuízos para os seres vivos.

Na região do vale do Aço, em Minas Gerais, extensas áreas têm sido utilizadas para o plantio de eucaliptos, as quais circundam muitos lagos naturais externos ao Parque Estadual do Rio Doce, expondo-os ao carreamento de folhas e lixiviados da serapilheira. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desses compostos na biota aquática.

3.3.3 – *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

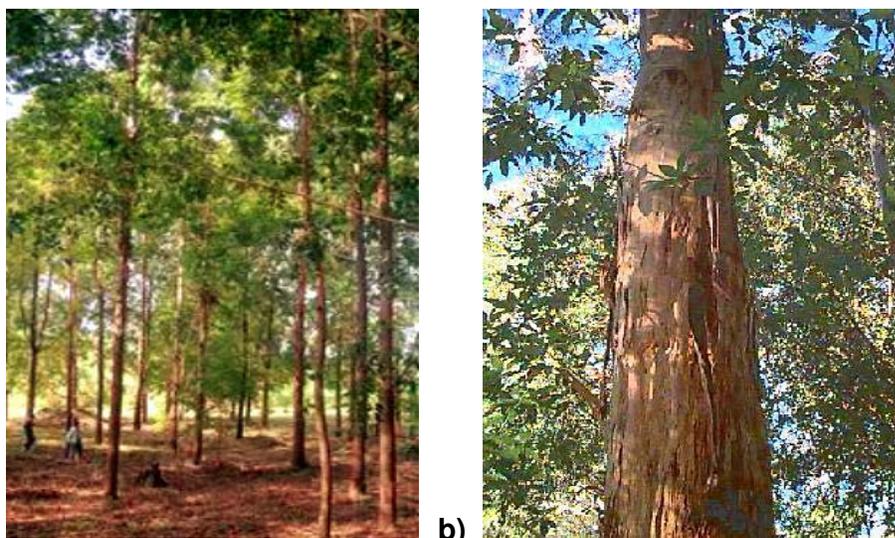
Eucalyptus grandis (Figura 2) é considerado uma espécie nativa do Norte de Nova Gales do Sul e da costa sul de Queensland, na Austrália. Distribui-se principalmente entre as latitudes 26 a 32°S e altitudes de 0 - 300 m e se adapta muito bem em regiões com precipitações entre 100 e 1700 mm com valores de temperaturas médias máximas entre 29 – 32°C e médias mínimas de 5 e 6°C (FAO, 1981).

A madeira dessa espécie é medianamente leve e fácil de trabalhar em operações de usinagem, sendo considerada de baixa estabilidade dimensional e de elevada permeabilidade. É uma das espécies mais versáteis e indicadas para usos múltiplos apresentando, no entanto, problemas de empenamento, contrações e rachaduras nas operações de desdobro e secagem (EYRE, 1980).

Já o *Eucalyptus urophylla* é uma espécie da Indonésia e do Timor, que ocorre naturalmente no Timor a partir de 500 metros de altitude, a 3000 metros.

Nessa região foram encontradas árvores de até 45 metros de altura e de quase dois metros de diâmetro (MARTIN e COSSALTER, 1975).

No Brasil o *E. urophylla* (Figuras 2) é uma das espécies mais cultivada por possuir diversos fins como: celulose, papel, chapa dura, carvão e outros fins. Essa espécie possui grande potencial de crescimento e tolerância ao fungo causador do cancro do eucalipto (*Cryphonectria cubensis*) (PRYOR et al., 1995).



Figuras 2 – *Eucalyptus urophylla* (a) e *Eucalyptus grandis* (b).

Fontes: (www.csiro.au/.../projects/dat/index.html) (a);

(www.anbg.gov.au/.../eucalyptus_grandis-bark.html) (b); Acesso: 17 de junho de 2007.

3.4- Conceitos e princípios da Ecotoxicologia

Devido a crescente preocupação com o meio ambiente e os efeitos adversos das atividades humanas sobre o mesmo, surgiu um novo ramo da Toxicologia e da Ecologia, a Ecotoxicologia (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A Ecotoxicologia alerta para as substâncias químicas que representam risco e, assim, sugere a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram graves danos aos ecossistemas naturais (PAASIVIRTA, 1991). Ela está relacionada a efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos,

especialmente em populações e comunidades dentro de um ecossistema definido, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (TRUHAUT, 1978).

A toxicidade de poluentes pode ser ocasionada por substâncias orgânicas e inorgânicas, utilizadas nos processos produtivos e auxiliares, nos diversos segmentos das atividades industriais. Outros fatores, tais como a biodisponibilidade e a interação das várias substâncias, podem também determinar a ocorrência e a intensidade de um efeito tóxico (BOUDOU e RIBEYRE, 1989).

A contaminação ambiental por substâncias químicas é consequência da grande industrialização, da utilização crescente de veículos e do uso intensivo dos recursos naturais pela agropecuária, silvicultura e mineração, e o aumento das emissões de metais tóxicos e de alguns compostos químicos orgânicos e persistentes, os quais representam perigo tanto para a vida selvagem quanto para o homem (FERNICOLA e SOUZA OLIVEIRA, 2002).

3.4.1 – Testes de toxicidade

Segundo Branco (1999), a toxicidade da água só pode ser estimada, com um certo grau de segurança, através de testes e ensaios realizados com organismos vivos. O princípio de todo teste de toxicidade baseia-se na identificação da resposta dos organismos-teste à presença de agentes tóxicos, sendo que esta resposta está associada à quantidade desses agentes (nível de exposição).

Várias espécies têm sido utilizadas como organismos-teste, entre elas microcrustáceos e larvas de insetos (ADAMS, 1995).

O uso dos testes ecotoxicológicos integra os conceitos da Ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da Toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (PLAA, 1982).

Existe uma variedade de testes de toxicidade já estabelecidos, sendo que alguns se encontram padronizados a nível nacional e internacional por associações ou organizações de normalização, como: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for

Testing and Materials (ASTM), American Water Works Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN) e International Organization for Standardization (ISO).

Os testes de toxicidade ou bioensaios realizados em laboratório incluem testes de toxicidade aguda e crônica, sendo que no presente estudo foram realizados testes de toxicidade aguda, em que os organismos são expostos a diferentes amostras ou concentrações de uma substância química por curto período de tempo, geralmente não constituindo uma parte substancial do seu ciclo de vida (LAURINI, 1979). O período de exposição pode variar de minutos a dias dependendo do organismo e do ciclo de vida.

Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (BIRGE et al., 1985).

Nos ensaios de toxicidade aguda usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. Em geral, observam-se mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados (VANLEEUEWEN, 1988a).

Alguns fatores podem afetar os resultados dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, dentre eles, os fatores bióticos, que estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos, sabendo-se que os organismos jovens são geralmente mais sensíveis às substâncias tóxicas do que os adultos. Por essa razão recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida em teste de toxicidade (USEPA, 2002).

Os principais fatores abióticos que podem interferir nos resultados dos ensaios são: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza, devendo por isso, também serem monitorados durante a execução do teste (ZAGATTO, 2006).

Já os testes realizados com amostras de sedimento constituem uma extensão da avaliação da qualidade da água, sendo importantes na identificação de áreas que apresentam toxicidade, mostrando-se eficientes na caracterização de possíveis efeitos diretos do sedimento (ZAGATTO et al., 1985). O objetivo dos testes de toxicidade com sedimento é avaliar a toxicidade dos sedimentos para os organismos bentônicos, podendo ser usados para determinar a relação entre efeitos tóxicos e biodisponibilidade (INGERSOLL, 1995; USEPA, 2000).

Devido a grande capacidade do sedimento em acumular compostos, este compartimento se torna um dos mais importantes na avaliação da qualidade de ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 1988; REYNOLDSON e DAY, 1993), tornando-se assim necessário avaliar o grau de contaminação destes ambientes de forma a se obter informações úteis para o gerenciamento dos ecossistemas aquáticos. A comunidade de macroinvertebrados bentônicos é um importante componente do sedimento de rios e lagos, sendo fundamental para a dinâmica de nutrientes, a transformação de matéria e o fluxo de energia (CALLISTO e ESTEVES, 1995). A bioturbação da superfície do sedimento e a fragmentação do *litter* proveniente da vegetação ripária são exemplos de processos envolvendo a comunidade bentônica, que resultam na liberação de nutrientes para a água e na aeração dos sedimentos (DEVÁI, 1990; CUMMINS et al., 1989), sendo a saúde e a qualidade de um corpo d'água dependente de tais processos.

3.4.2 – Organismos-Teste

3.4.2.1 – *Daphnia* spp

Os microcrustáceos, de uma forma geral, desempenham um papel importante na cadeia alimentar, pois são consumidores primários, alimentam-se de algas e servem de alimentos para consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Assim, mudanças na população e no comportamento destes organismos podem interferir nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático (ALLAN, 1976; CETESB, 1999).

O gênero *Daphnia*, pertencente à classe Crustácea, ordem Cladocera, família Daphnidae, apresenta uma ampla distribuição em ambientes de água doce temperados. No Brasil é relatada a presença natural das espécies *Daphnia gessneri*, *D. ambigua* e *D. laevis* (MATSUMURA – TUNDISI, 1984), sendo que para o cultivo em laboratório são bastante utilizadas as espécies *D. similis* e *D. magna*, as quais não ocorrem naturalmente no Brasil (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Estes organismos planctônicos reproduzem-se por partenogênese e durante a maior parte do ano a população natural é constituída por fêmeas. O número de ovos partenogenéticos é variável e está relacionado com a qualidade do alimento e outros fatores físicos tais como temperatura, intensidade luminosa, oxigênio dissolvido, pH e concentração de íons. Os ovos produzidos se desenvolvem rápida e diretamente em miniatura dos adultos sem estágio larval intermediário (CETESB, 1994; PASCHOAL, 2002).

O gênero *Daphnia* (Figura 3) apresenta organismos com 0,5 a 5,0 mm de comprimento. O corpo é protegido por uma carapaça transparente, bivalente, exceto a cabeça e as antenas. Possui olhos compostos bem evidentes na cabeça, sendo sensível à mudança da qualidade e quantidade de luz (BUIKEMA e SHERBERGER, 1977).

Dafinídeos são animais ideais para o uso em testes de toxicidade, pois são bastante sensíveis a poluentes e facilmente cultivados em laboratório (FREAR e BOYD, 1967) e seu cultivo é realizado seguindo as normas da ABNT (2004) descritas no Capítulo I do presente estudo.

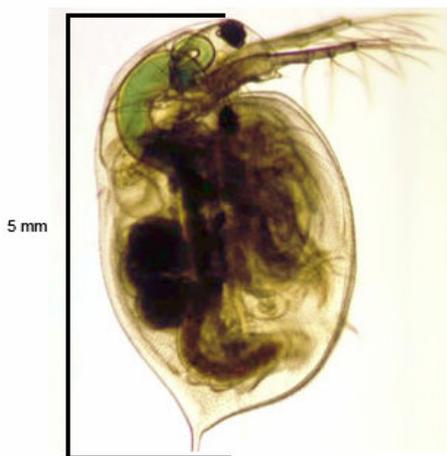


Figura 3 – *Daphnia similis*.

Fonte: [http:// www.kuleuven-kortrijk.be/.../Daphnia%20similis.htm](http://www.kuleuven-kortrijk.be/.../Daphnia%20similis.htm)). Acesso: 17 de junho de 2007.

3.4.2.2 – *Ceriodaphnia* spp

Este gênero é representado por microcrustáceos de água doce, facilmente encontrados em lagos, represas e lagoas. Taxonomicamente, *Ceriodaphnia* lembra *Daphnia*, porém é menor (0,77 – 0,88 mm quando adulta) e com tempo de reprodução mais rápido (3 a 4 ninhadas por semana, sob condições favoráveis). Além disso, espécimes de *Ceriodaphnia* são mais arredondados e não possuem a projeção rostral proeminente, típica de *Daphnia* (CETESB, 2006).

O gênero *Ceriodaphnia* (Figura 4) é filtrador, alimentando-se de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água. Sua reprodução é geralmente partenogenética (assexuada), em que fêmeas produzem células diplóides que originam novas fêmeas com o mesmo genótipo, resultando, portanto, em uma população homogênea, tornando-se reprodutiva após 3 a 4 dias do nascimento (CETESB, op. cit), para a utilização em testes de toxicidade as *Ceriodaphnias* spp são cultivadas seguindo as normas da ABNT (2005) descritas no Capítulo I do presente estudo.

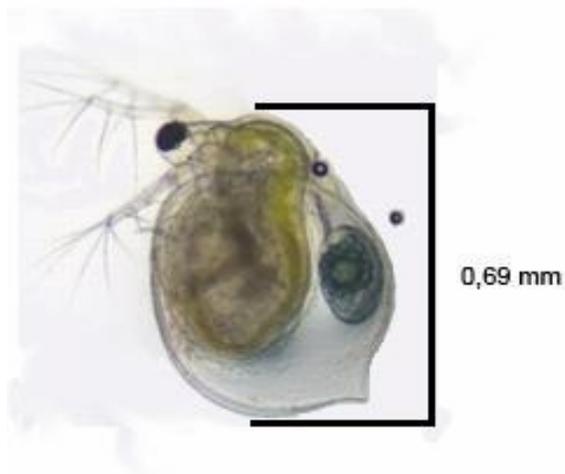


Figura 4 – *Ceriodaphnia* spp.

Fonte: (www.internal.eawag.ch/.../html/ceriodaphnia.html). Acesso: 28 de maio de 2007.

3.4.2.3 – *Chironomus spp*

Para os testes com sedimentos, entre os organismos-teste freqüentemente utilizados, incluem-se os macroinvertebrados bentônicos, os quais ocupam uma posição chave na cadeia alimentar como consumidores de detritos nos ecossistemas aquáticos. Na região bentônica, as larvas de insetos desempenham um importante papel na conversão tanto de organismos vivos como da biomassa morta em alimento para outros consumidores. Por outro lado, devido às diferenças dos hábitos alimentares entre os organismos que vivem no ambiente aquático recomenda-se que a avaliação da toxicidade do sedimento seja feita com organismos de diferentes níveis tróficos (PERSOONE e JANSSEN, 1993; DORNFELD, 2002; FONSECA e ROCHA, 2004).

Para testes com amostras de sedimento, os organismos bentônicos são os melhores indicados, pois vivem em contato direto com os sedimentos sólidos e água intersticial. Além disso, já existem dados sobre a sensibilidade de algumas espécies a poluentes, bem como dados sobre a biologia de determinadas espécies. Alguns anfípodos (como *Hyaella azteca* e *Gammarus spp*) e larvas de insetos (*Hexagenia limbata*, *Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*) se mostraram eficientes em detectar a toxicidade de sedimentos em vários estudos. Porém, existem problemas em relação ao cultivo e ao desenvolvimento de testes para avaliação de efeitos crônicos (ZAGATTO, 1999).

Dentre os insetos aquáticos, organismos da família Chironomidae são extremamente adaptáveis a todos os tipos de ambientes, apresentando uma grande riqueza de espécies. Devido a estes fatores, dentre outros, os quironomídeos têm sido utilizados como organismos-teste na avaliação da toxicidade do sedimento (ELDER, 1990). Esses organismos vivem em casulos a poucos centímetros do sedimento e constituem freqüentemente a proporção mais significativa da biomassa bentônica (GIESY et al., 1988), além de desempenharem papel importante na reciclagem de nutrientes do sedimento e serem importantes na dieta de aves e peixes de água doce (BAUDIN e NUCHO, 1992).

A espécie de quironomídeo *Chironomus xanthus* (Figura 5) vem sendo utilizada como organismo-teste em diversos estudos ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade do sedimento (PAMPLIN, 1999; FONSECA e ROCHA, 2004) e da sensibilidade a substâncias de referência (RODGHER, 1998), mostrando ser uma espécie de fácil manutenção em laboratório (com alta fecundidade e acasalamento sem enxameamento) e com um curto ciclo de vida.

O ciclo de vida de *C. xanthus* é dividido em 4 fases distintas, três das quais são aquáticas: um estágio de ovo, um estágio larval consistindo em 4 instares, um estágio de pupa e um estágio (aéreo) adulto. Nas condições de temperatura entre 19 e 26°C, *C. xanthus* completa o ciclo de vida entre 16 e 17 dias (STRIXINO e STRIXINO, 1982), seu cultivo é realizado seguindo as normas da USEPA (1996) descritas no Capítulo I.

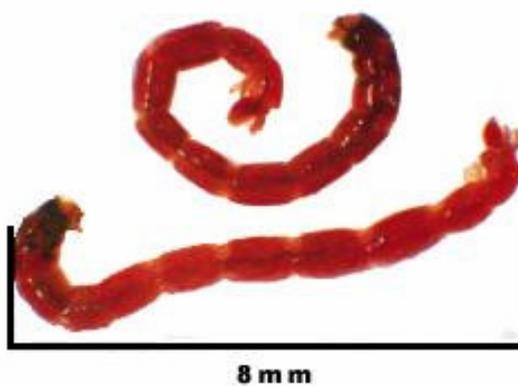


Figura 5 – *Chironomus xanthus*.

Fonte: (http://entomology.unl.edu/lgh/marine_insects/chironomus.gif). Acesso: 18 de maio de 2007.

Estes organismos possuem uma coloração vermelha devido à presença de hemoglobina, o que os ajuda a tolerar períodos com baixas concentrações de oxigênio. Outro fator favorável é que a coloração vermelha e o tamanho de *Chironomus xanthus* facilitam a separação destes organismos após o teste (DORNFELD, 2002).

Organismos não bentônicos também podem ser utilizados em testes com sedimentos, pois existem métodos bem conhecidos e padronizados, sendo de grande importância nas extrapolações com o objetivo de avaliar material dragado (ZAGATTO, 1999). A escolha de organismos não bentônicos para a avaliação da toxicidade em sedimentos também se justifica pelo fato de existir uma forte interação entre os compartimentos água e sedimento, lembrando que os contaminantes associados aos sedimentos afetam a comunidade bentônica diretamente bem como a comunidade não bentônica (BURTON, 1992).

4 – ÁREA DE ESTUDO

No Brasil, existem três grandes sistemas lacustres: o sistema de lagos de várzea do Amazonas, o Pantanal Matogrossense e o Sistema de lagos do Vale do Rio Doce (Figura 6 e 7). Desses sistemas, os dois primeiros destacam-se por suas flutuações no nível de água, enquanto que o sistema de lagos do rio Doce é constituído por aproximadamente 160 lagos isolados, a maioria deles sem conexão com o rio. As flutuações de nível desse sistema de lagos são muito pequenas, o que lhes dá características extremamente peculiares do ponto de vista de funcionamento ecológico (TUNDISI, 1981).

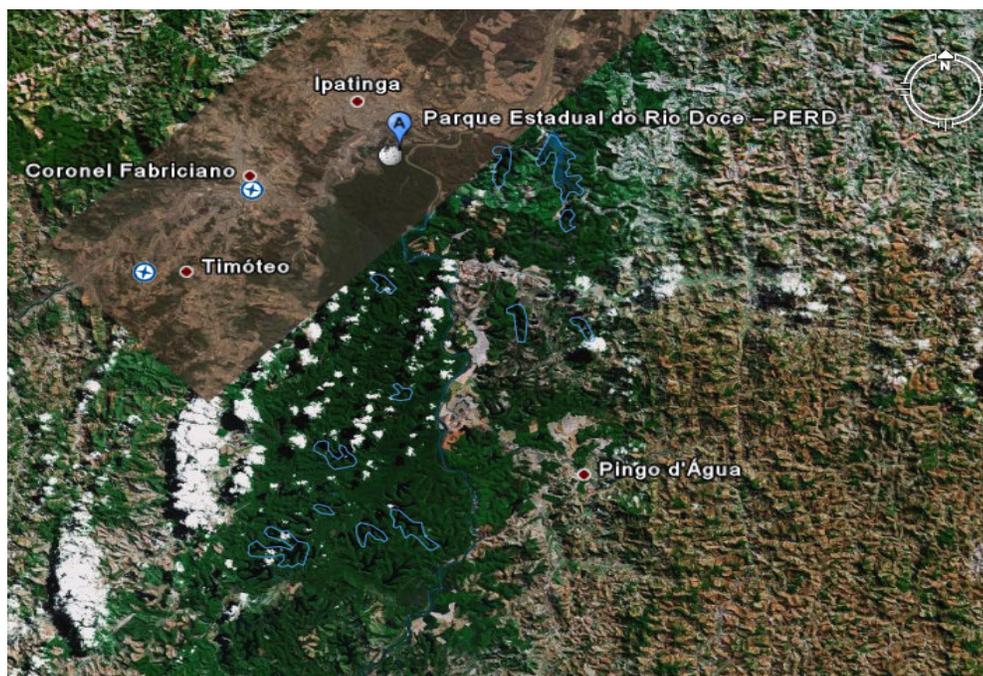


Figura 6 – Localização do Parque Estadual do Rio Doce.

Fonte: (<http://maps.google.com.br/>). Acesso: 25 de agosto 2007.

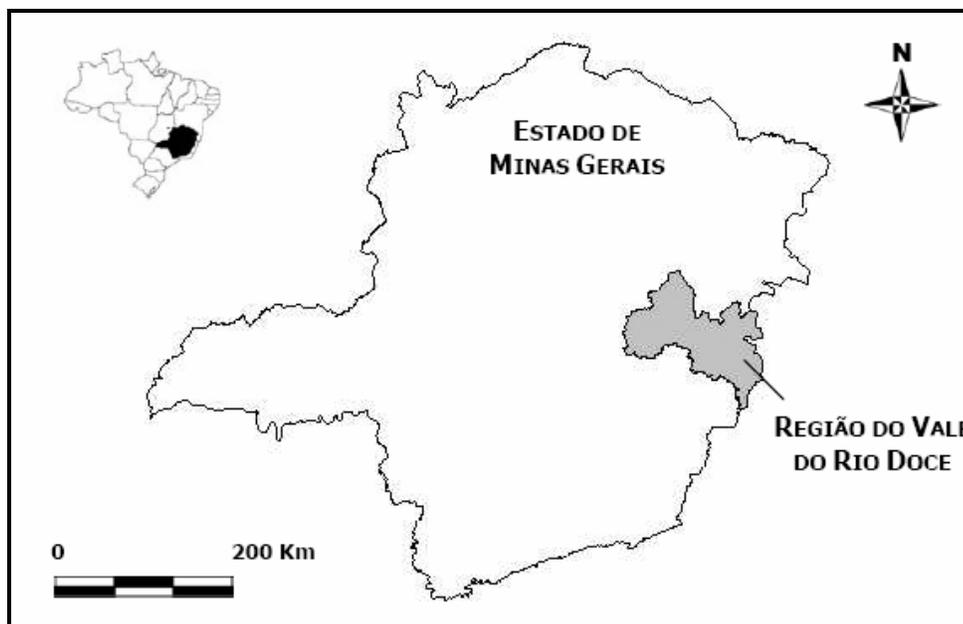


Figura 7 – Delimitação político-administrativa do Vale do Rio Doce.

Fonte: MORETTO (2001).

Entretanto, podem ocorrer alterações na qualidade da água destes lagos, particularmente no caso dos lagos externos ao Parque Estadual do rio Doce (PERD), devido à variação nas características físicas, químicas e biológicas do material alóctone carreado do sistema terrestre (MORETTO, 2001), representado essencialmente por folhas de eucaliptos, que constituem extensas áreas de plantio ao redor dos lagos.

O Parque do rio Doce está localizada a sudeste de Minas Gerais, entre as coordenadas 42°38'30" e 48°28'18" oeste e 19°48'18" e 19°29'24" sul (TUNDISI e SAIJO, 1997). A Bacia do rio Doce compreende uma área de drenagem de 83.400 Km², dos quais 86% pertencem ao Estado de Minas Gerais e 14% ao Estado do Espírito Santo, abrigando uma população de 3,1 milhões de habitantes, distribuídos em 222 municípios (MELLO, 1997) .

Limita-se ao sul com a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, a oeste com a bacia do rio São Francisco e, em pequena extensão, com a do rio Grande. Ao norte, limita-se com a bacia dos rios Jequitinhonha e Mucuri e a noroeste com a bacia do rio São Mateus (MELLO, op.cit.).

O clima da região é tropical úmido e a média anual de precipitação é de 1480 mm, sendo a temperatura média de 21,9°C com máximas de 40°C no verão e mínima de 3°C no inverno (TUNDISI et al., 1997).

O rio Doce corre por uma extensão de 875 Km e durante esse percurso seus tributários mais importantes são os rios Piracicaba, Casca, Santo Antônio e Matipó (ANDRADE, 2003).

O sistema de lagos do Vale do rio Doce está situado em uma área de grande importância para o desenvolvimento econômico do estado de Minas Gerais e para o Brasil, por possuir um intenso pólo industrial denominado Zona Metalúrgica ou Vale do Aço onde se encontram importantes usinas siderúrgicas, como a Usina Siderúrgica de Minas Gerais (USIMINAS), a Aços Especiais Itabira S.A. (ACESITA) e a Companhia Siderúrgica Belgo-Mineira (CSBM) (DE PAULA, 1997).

Tais empreendimentos industriais, que apresentam níveis de qualidade e produtividade industrial que estão entre os maiores do mundo, desempenham papel significativo nas exportações brasileiras de minério de ferro, aço e celulose (TUNDISI e SAIJO, 1997).

Outra área de importância desta região é a denominada Zona da Mata, onde está localizada a Zona Geográfica do rio Doce, constituída por uma rica drenagem e por remanescentes de Mata Atlântica. É nessa zona que se encontra inserido o sistema de lagos do Vale do rio Doce, constituído por cerca de 160 corpos lacustres preservados, sendo que 50 situam-se dentro do Parque Estadual do Rio Doce (PERD).

Ao longo de toda a bacia hidrográfica do rio Doce, a economia é bastante diversificada (Figura 8):

- Alto rio Doce: grandes projetos de mineração (minério de ferro), agricultura e pecuária;
- Médio rio Doce: está localizado o maior pólo siderúrgico da América Latina, além de indústrias de celulose, carvão vegetal, agropecuária e hidroelétrica de médio porte nos rios Piracicaba e Santo Antônio;

- Baixo rio Doce: cultura de café e agropecuária.

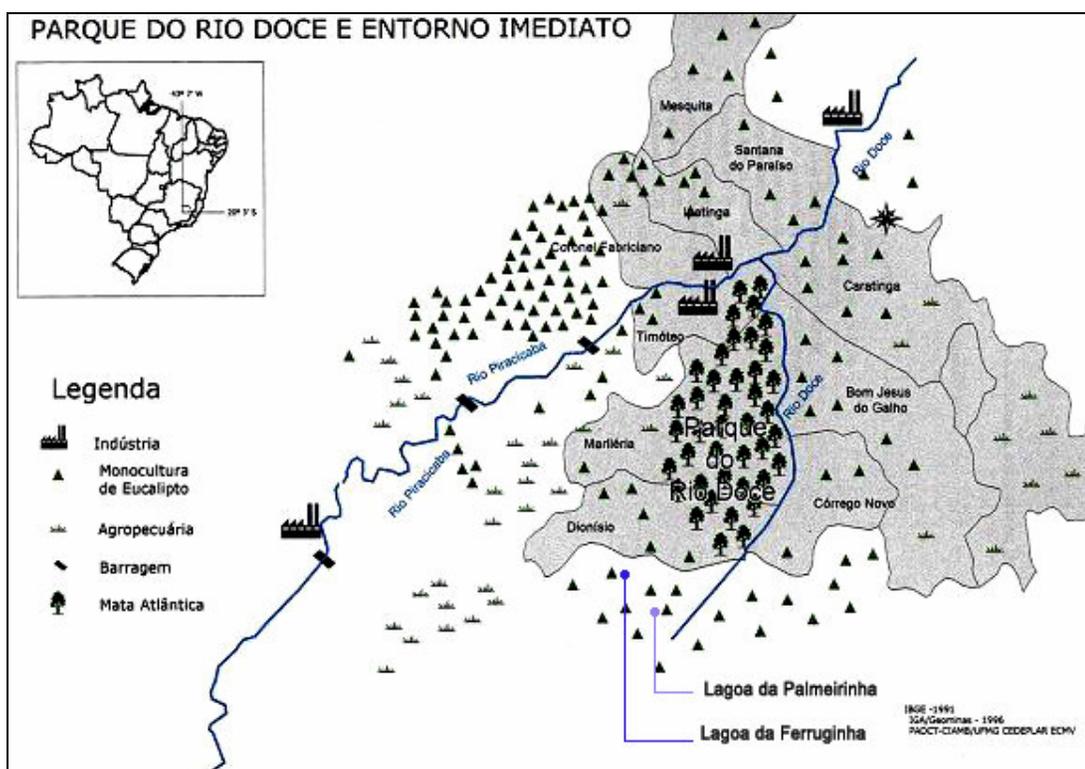


Figura 8 – Bacia do rio Doce e seus principais afluentes no entorno do Parque Estadual do Rio Doce (PERD).

Fonte: BARBOSA et al. (2000).

Além destas atividades, vale ressaltar a presença de indústrias de celulose e carvão vegetal que, ao longo dos anos, substituiu grande parte da floresta de Mata Atlântica por maciços florestais de eucalipto às margens do rio Doce e imediatamente após a confluência com o Rio Piracicaba (MORETTO, 2001). Juntas, a pecuária extensiva, a silvicultura industrial e a monocultura de eucaliptos ocupam pelo menos 80% da área total da bacia.

Originalmente, essa região era coberta por Mata Atlântica, mas a intensa devastação restringiu o revestimento florístico originário basicamente à área do Parque Estadual do Rio Doce. As demais matas correspondem a uma vegetação que sofreu influência antrópica intensa, constituindo-se em vegetação secundária.

Estima-se que menos de 7% da área possui hoje cobertura vegetal (FONSECA, 1983 e 1985, apud UFMG/PADCT, 1997). Destes, menos de 1% encontra-se em estágio primário (MITTERMEIER et al, 1982; FONSECA, 1985 apud UFMG/PADCT, 1997).

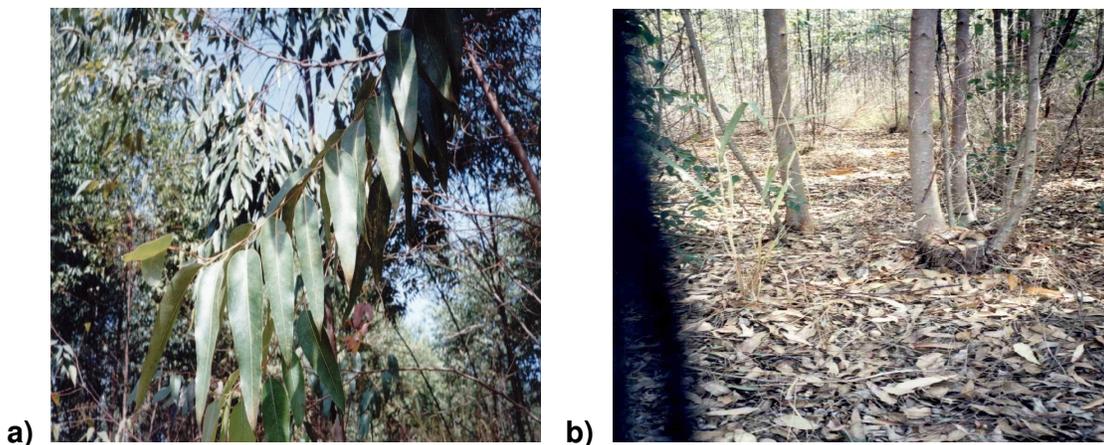
Segundo pesquisas realizadas pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, 95% das terras da bacia constituem pastos e capoeiras, demonstrando a predominância da atividade pecuária. As espécies mais difundidas na formação de pastagens são o capim gordura (*Melinis minutiflora*) em áreas situadas acima da cota altimétrica de 800 m e o colônio (*Panicum maximum*) abaixo dessa altitude. As florestas plantadas, constituídas principalmente por espécies do gênero *Eucalyptus*, são expressivas no médio rio Doce.

O complexo mineiro-siderúrgico também contribuiu para a expansão das matas de eucalipto para a produção de carvão empregado nas usinas siderúrgicas da região. Minas Gerais possui hoje a maior área plantada de eucalipto do Brasil, cerca de 2.500.000 hectares (DE PAULA, 1997).

A bacia do rio Doce também possui um sistema de drenagem com papel fundamental na economia do leste brasileiro, uma vez que além de fornecer água para diversos fins, como uso doméstico, industrial, agropecuário e geração de energia elétrica, ainda recebe esgotos, rejeitos e efluentes produzidos pelos centros urbanos e industriais (DE PAULA, op cit.).

Os ambientes aquáticos considerados no presente estudo situam-se na área externa ao Parque Estadual do rio Doce. As lagoas Palmeirinha e Ferruginha são, respectivamente, circundadas por plantios de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (Figuras 9) e possuem características semelhantes.

No Brasil, poucos estudos avaliaram os efeitos ecológicos de plantações de *Eucalyptus* em ambientes aquáticos. Alguns autores mostraram a influência negativa destas monoculturas sobre comunidades perifíticas e de macroinvertebrados bentônicos (SABARÁ, 1994; CALLISTO et al., 2000; 2002), diferindo, entretanto, de outros autores, que não detectaram efeitos na ictiofauna (VONO e BARBOSA, 2001)



Figuras 9 – Áreas de plantio de *Eucalyptus grandis* (a) e a camada de serapilheira de *Eucalyptus urophylla* (b) – Região do Vale do rio Doce – Minas Gerais. (Fotos: Arnola Cecília Rietzler).

4.1 - Lagoa Palmeirinha e lagoa Ferruginha

De acordo com relatório científico disponibilizado pelo Programa de Estudos de Longa Duração (PELD, 2005), estudos limnológicos realizados na lagoa Palmeirinha, nos períodos de seca e chuvoso, mostraram estratificação térmica e química em ambos os períodos do ano.

Na lagoa Palmeirinha (Figura 10) o disco de Secchi atingiu a profundidade de 2,0 m, com zona eufótica de 6,0 metros. Para os dois períodos do ano observou-se estratificação térmica e química. Maiores valores de condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos foram registrados no hipólímnio no período de chuva. O pH mostrou-se levemente ácido nos dois períodos amostrados.

No período de chuvas, a temperatura da água variou entre 26,8 e 30,7 °C e as concentrações de oxigênio dissolvido entre 4,7 e 11,6 mg L⁻¹, com os menores valores registrados no fundo. Observou-se também neste período uma queda acentuada nos valores do potencial de oxi-redução a partir de 5,0 m, atingindo valores negativos próximo ao fundo, onde prevaleceram processos redutivos. O pH variou entre 5,2 e 6,0 com o menor valor registrado a 4,0 m. A condutividade elétrica variou entre 38,0 e 110,0 μS cm⁻¹ e os valores de sólidos totais dissolvidos entre 20,0 e 70,0 mg L⁻¹, ambas variáveis com maiores valores no fundo.

No período de seca, os valores de temperatura da água variaram entre 23,9 e 26,3 °C e as concentrações de oxigênio dissolvido entre 7,1 e 8,2 mg L⁻¹, com os maiores valores registrados na superfície. Nesse período, os valores do potencial de oxi-redução foram positivos em quase toda a coluna d'água. O pH variou entre 4,8 e 5,0, com o menor valor também sendo registrado no hipolimnio. A condutividade elétrica variou entre 45,0 e 68,0 μS cm⁻¹ e os valores de sólidos totais dissolvidos foram de 30,0 mg L⁻¹ em toda coluna d'água. Não foi observada estratificação em relação ao potencial de oxi-redução, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos. Além disso, não foi observada uma desestratificação completa da coluna d'água, possivelmente pelo fato de que a lagoa Palmeirinha está “encaixada” em um vale e com uma mata de entorno um pouco mais densa, o que a protege da ação do vento sobre a mistura da coluna d'água.



Figura 10 – Lagoa Palmeirinha, circundada por plantações de *Eucalyptus grandis*.
(Foto: Arnola C.Rietzler)

Dados de nutrientes da Lagoa Palmeirinha (Tabela 1) obtidos em estudo realizado por equipe conjunta do projeto FAPEMIG/FUNDEP e do PELD/CNPq (2005) mostraram que as concentrações de nutrientes são baixas na lagoa Palmeirinha (oligotrófica).

Tabela 1 – Valores de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontrados na lagoa Palmeirinha em 2005.

VARIÁVEL/PERÍODO	* SECA/2004	CHUVA/2005	SECA/2005
NITRITO	6	0,78	8,62
NITRATO	3,6	0,0	0,0
AMÔNIA	378,5	0,0	172,93
FÓSFORO TOTAL	12,4	14,34	17,52

* Dados cedidos pelo Laboratório de Ecologia de Processos e Qualidade de Água - ICB/UFMG - Prof. Francisco Barbosa.

A lagoa Ferruginha (Figura 11), embora não tenha sido anteriormente estudada, em geral apresenta características limnológicas semelhantes à lagoa Palmeirinha, sendo sua área de entorno reflorestada com *Eucalyptus* spp., incluindo-se *E. urophylla*. Dentre as variáveis limnológicas medidas *in situ* em outubro de 2006, verificou-se valores de pH e condutividade correspondentes a 5,14 e 40,00 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, e de sólidos suspensos e potencial redox equivalentes a 0,03 mg.L^{-1} e 3,00 mV. Além disso, dados de nutrientes recentemente obtidos pelo Laboratório de Ecologia de Processos (ICB/UFMG) mostraram valores próximos aos encontrados na lagoa Palmeirinha, exceto no caso de amônia, cujos valores foram mais elevados na mesma. (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontrados na lagoa Ferruginha em outubro de 2006.

VARIÁVEL	VALORES
NITRITO	1,07
NITRATO	4,29
AMÔNIA	28,20
FÓSFORO TOTAL	26,82

* Dados cedidos pelo Laboratório de Ecologia de Processos e Qualidade de Água - ICB/UFMG - Prof. Francisco Barbosa.



Figura 11 – Lagoa Ferruginha, circundada por plantações de *Eucalyptus urophylla*.
(Foto: Arnola C.Rietzler)

CAPITULO I

“Avaliação ecotoxicológica de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* mediante decomposição foliar e testes de toxicidade em laboratório”.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Vegetação e recursos hídricos

Os ecossistemas de água doce são compostos, principalmente, pelas comunidades planctônicas (fitoplâncton e zooplâncton), bentônica (fauna e flora associados ao sedimento), perifítica (algas e animais associados a um substrato orgânico ou mineral), de macrófitas (vegetação aquática macroscópica de importante papel na dinâmica dos nutrientes) e nectônica (representada principalmente pelos peixes e outros vertebrados aquáticos) (WETZEL, 1975).

O tipo de vegetação é um dos atributos mais importantes dos sistemas terrestres que podem afetar a composição de organismos e a qualidade da água em corpos lacustres, pela diferença qualitativa e quantitativa na entrada do “litter” ou serapilheira e dos nutrientes no corpo lacustre (MORETTO, 2001).

Abelho e Graça (1996) afirmam que corpos d’água que apresentam florestas naturais no entorno contêm maior número de invertebrados do que aqueles que são constituídos por agroecossistemas, a exemplo das florestas de eucaliptos.

No caso de monoculturas, as alterações da bacia de drenagem e, conseqüentemente, na qualidade da água, são desencadeadas desde o início com a retirada da cobertura natural que elimina praticamente toda a diversidade biológica da região. Além disso, a construção de estradas, o preparo do solo com adubação e uso rotineiro de fogo são forças que incrementam o nível do impacto antropogênico (BARBIERI et al., 1997).

Segundo Barbieri (op. cit), os principais efeitos da atividade de monocultura de eucaliptos referem-se ao grande consumo de água e nutrientes, alterações nas propriedades do solo que podem ocasionar erosão, eventuais efeitos alelopáticos

próprios da vegetação de eucaliptos sobre outras espécies vegetais, e quando em contato com o meio ambiente podem propiciar caráter de toxicidade, trazendo sérios prejuízos para os seres vivos.

Além disso, são relatadas baixas taxas de decomposição em solo de florestas de *Eucalyptus* spp, acarretando acúmulo de material orgânico e, por conseguinte, aumento da quantidade de nutrientes na interface serapilheira-solo (ADAMS e ATTIWIL, 1986; LOUZADA et al., 1997; GAMA-RODRIGUES e BARROS, 2002).

Essa baixa taxa de decomposição decorre, em parte, da eficiente retranslocação de nutrientes (ciclagem bioquímica) pelo eucalipto, produzindo serapilheira de baixa qualidade nutricional, especialmente em N e P (GAMA-RODRIGUES e BARROS op. cit). Isso acarreta, ao menos no primeiro ano de decomposição, a predominância do processo de imobilização desses elementos (GUO e SIMS, 1999; GAMA-RODRIGUES e BARROS, 2002).

O eucalipto é uma planta que apresenta efeitos alelopáticos, interferindo no desenvolvimento das plantas, na atividade microbológica do solo e, conseqüentemente, no seu processo de decomposição (SILVA e COSTA, 2004).

As partes vegetativas do eucalipto são bastante complexas quimicamente. Desta forma, é normal esperar alguma alteração na atividade microbológica do solo com a presença destes resíduos (LIMA, 1993).

Florenzano (1956) encontrou uma concentração muito baixa de bactérias nitrificadoras sob o eucalipto, sugerindo que os resíduos de eucalipto poderiam produzir alguma ação inibidora nestes microorganismos. Lozano e Velasco (1981) encontraram resultados semelhantes. Entretanto, em outra região da Itália, Florenzano (1959) encontrou uma quantidade maior de bactérias nitrificadoras sob eucalipto, além de uma maior acumulação de húmus em comparação aos resultados obtidos sob plantações de *Pinus* e culturas agrícolas.

O estudo da ciclagem de nutrientes minerais, via serapilheira, é fundamental para o conhecimento da estrutura e funcionamento de ecossistemas florestais. Parte do processo de retorno de matéria orgânica e de nutrientes para o solo florestal se dá através da produção de serapilheira, sendo esta considerada o meio mais importante de transferência de elementos essenciais da vegetação para o solo. (PAGANO e DURINGAN, 2000).

1.2 – Formação de serapilheira

A serapilheira é particularmente importante por atuar na superfície do solo como um sistema de entrada e saída, recebendo entradas via vegetação e, por sua vez, decompondo-se e suprindo o solo e as raízes com nutrientes e matéria orgânica, sendo essencial na restauração da fertilidade do solo em áreas em início de sucessão ecológica (EWEL, 1976). A decomposição dos resíduos orgânicos que formam a serapilheira é o principal processo de ciclagem de nutrientes em um ecossistema florestal (MONTAGNINI e JORDAN, 2002).

Os padrões de deposição de serapilheira introduzem heterogeneidade temporal e espacial no ambiente, podendo afetar a estrutura e a dinâmica da comunidade de plantas (FACELLI e PICKETT, 1991; MOLOFSKY e AUSGSPURGER, 1992).

Em zonas de troca entre os ecossistemas terrestres e aquáticos chamados de zonas ripárias existem alguns processos de transferência importantes, exclusivos de matas ciliares: o primeiro é a entrada de sedimentos a partir das áreas adjacentes, transportados pelas águas das chuvas ou de rio, sendo retidos pela faixa florestal que atua como filtro; o segundo trata da entrada de nutrientes também através do fluxo lateral do lençol freático, transportando nutrientes das partes mais elevadas para a faixa ciliar (PAGANO e DURIGAN, 2000).

Os fatores que afetam a forma e a ciclagem de nutrientes estão intimamente ligados às condições climáticas e aos compostos fenólicos, bem como aos aspectos ambientais e aos poluentes, variando de espécie para espécie (SCHUMACHER, 1992; POGGIANI e SCHUMACHER op. cit). Em geral, observa-se um aumento da deposição da serapilheira até a idade em que as árvores atingem a maturidade ou fecham as suas copas. Após esse ponto pode ocorrer ligeiro decréscimo ou estabilização (BRAY e GHORAN, 1964).

A quantidade de serapilheira produzida por uma floresta pode ser influenciada por fatores como as espécies vegetais existentes, a idade das plantas, o solo e o clima. As espécies vegetais afetam significativamente a produção de serapilheira, sendo esse efeito atribuído, principalmente, à capacidade de adaptação das espécies ao meio (JENSEN, 1974).

Em florestas de eucalipto, a produção anual de serapilheira é significativamente influenciada pela idade, independente de sua densidade (McCOOL, 1966).

A concentração de nutrientes no material de serapilheira é importante porque influencia a taxa de decomposição e a quantidade de nutrientes liberados (JENSEN op cit.). O conteúdo de minerais é usualmente baixo em locais pouco férteis e é aumentado com a fertilidade do solo (BRAY e GORHAM op. cit).

As espécies vegetais também desempenham influência relevante na concentração de nutrientes na serapilheira. Segundo Ashton (1975), em folhas caídas de *Eucalyptus regnans*, o conteúdo de nutrientes é bem menor que em muitas florestas nativas.

1.3 – Decomposição e liberação de nutrientes e outras substâncias da serapilheira

A decomposição das folhas das árvores e outros detritos orgânicos ocorre tradicionalmente em três fases mais ou menos seqüenciais (SUBERKROPP et al., 1976): lixiviação, colonização microbiana e fragmentação, em que intervêm paralelamente processos físicos e biológicos (Figura 12). A intensidade, duração e dominância destas fases depende de vários fatores intrínsecos (características físicas e químicas da folha) e de fatores ambientais extrínsecos (abióticos e bióticos) tais como a intensidade da corrente, a temperatura ou a quantidade de invertebrados detritívoros (GESSNER et al., 1999).

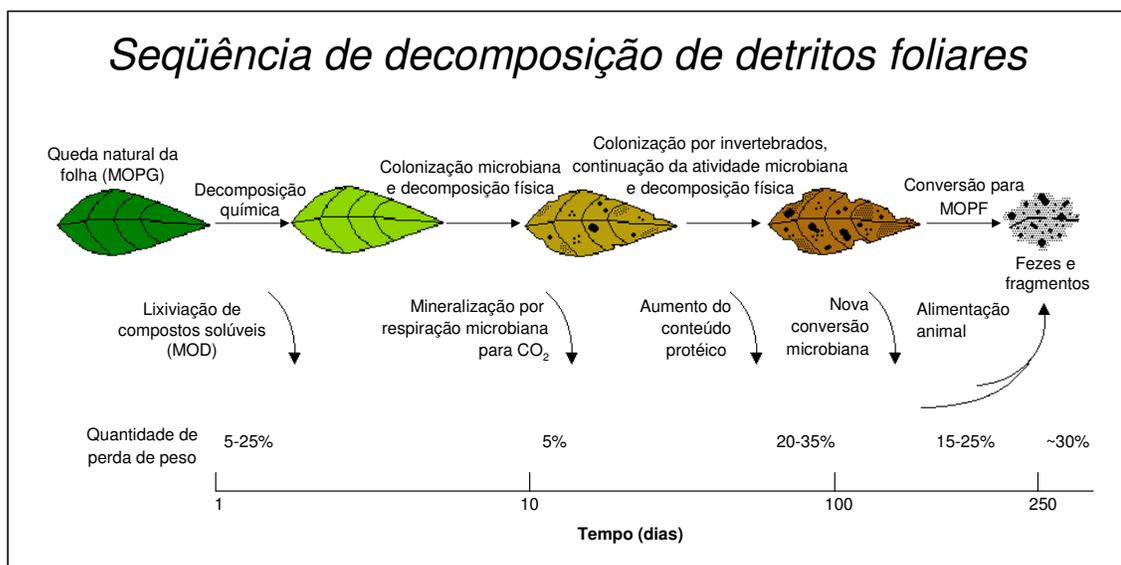


Figura 12 – Etapas de decomposição de detritos foliares.

Fonte: (http://www.icb.ufmg.br/big/benthos/index_arquivos/Page1764.htm). Acesso: 15 de setembro de 2007.

A decomposição microbiana das folhas é fundamentalmente efetuada por um grupo heterogêneo de fungos, os hifomicetos aquáticos. Estes hifomicetos aquáticos dominam as fases iniciais da decomposição, podendo atingir, de 8 a 18% da totalidade da massa foliar (GESSNER e CHAUVET, 1994). Tem sido várias vezes demonstrado que a colonização por fungos determina um incremento no valor nutritivo das folhas, estimulando o seu consumo pelos invertebrados (ARSUFFI e SUBERKROPP, 1985).

Quanto à terceira fase da decomposição, em um estudo realizado por Graça et al. (2001), calculou-se que um grupo particular de detritívoros, os fragmentadores ou organismos que ingerem diretamente as folhas, constitui cerca de 41 a 45% da biomassa total de invertebrados em alguns ribeiros do Centro de Portugal. Os fragmentadores desempenham um papel fundamental na conversão de partículas grosseiras de matéria orgânica em partículas finas que servirão de alimento a outros grupos de detritívoros como os coletores e os filtradores (GRAÇA op cit.).

A importância dos detritívoros fragmentadores na decomposição foliar parece ser inegável, podendo estes ser responsáveis por mais de 30% da degradação (ALLAN, 1995). A quantidade e a qualidade dos detritos fornecidos pela vegetação da zona ripária são assim determinantes para a biomassa e diversidade de invertebrados aquáticos.

Por outro lado, a decomposição é um processo complexo e, freqüentemente, prolongado, que ocorre a taxas constantes, variando com a natureza do substrato e com as características do ambiente (SATCHELL, 1974). A matéria orgânica morta sobre o solo desempenha um papel importante na determinação da estrutura e função de um ecossistema, por sua atuação como fonte de energia para os organismos heterotróficos e como reservatório de nutrientes para ciclagem dentro do sistema (SINGH e GUPTA, 1977; SANTOS e GRISI, 1979).

A decomposição da serapilheira sob floresta é de fundamental importância para o ciclo dos nutrientes no solo (GEORGE, 1982). Entre os fatores que podem estar envolvidos na composição química do substrato, estão a presença de substâncias inibidoras do crescimento e os fatores físicos, como a temperatura e a umidade (NAGY e MACAULEY, 1982).

O material vegetal que chega ao solo possui composição química e fisicamente heterogênea, sendo que os constituintes das plantas são comumente divididos em: celulose, hemicelulose, lignina, fração solúvel em água, fração solúvel em álcool e éter, proteínas e minerais (ALEXANDER, 1977).

Os componentes da serapilheira, solúveis em água, constituem fontes de energia prontamente disponíveis para os decompositores, que influenciam os estágios iniciais de decomposição. Essas substâncias desaparecem rapidamente da matéria orgânica devido à utilização microbiana e lixiviação (SING e GUPTA, 1977).

Apesar do efeito benéfico das substâncias hidrossolúveis sobre a biota do solo, vários autores constataram efeitos inibitórios de extratos aquosos de várias espécies vegetais sobre diversos microrganismos (DELLA BRUNA, 1985).

Estudos sobre a diversidade dos fungos associados às folhas de *Eucalyptus* spp são raros no Brasil. Conhecem-se alguns hifomicetos associados à decomposição de suas folhas, conforme Sutton e Hodges apud Grandi (1993), bem

como os efeitos inibitórios de substâncias alelopáticas, presentes na serapilheira de *Eucalyptus* spp e no extrato aquoso preparado a partir das folhas, sobre o número de bactérias e sobre a diversidade e quantidade de colônias fúngicas *in vitro* (DELLA BRUNA et al., 1989, 1991). No entanto, pouco se conhece sobre o efeito dessas substâncias alelopáticas sobre a diversidade dos fungos terrestres e aquáticos no ambiente natural.

Rice (1979), estudando a toxicidade de extratos aquosos de *Euphorbia corolata*, *Helianthus annuus* e *Ambrosiana elatior* sobre *Rizobium*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter* e *Nitrobacter*, atribuiu o efeito tóxico à presença de galotaninos, capazes de precipitar proteínas, e de ácidos clorogênicos, que inibem certos sistemas enzimáticos.

A toxicidade das substâncias solúveis em água aos microrganismos acontece em função da sua concentração. Knosel apud Dommergues e Mangenot (1970), verificou que os ácidos fenólicos liberados pela decomposição das plantas são inibitórios a altas doses e estimulantes em pequenas doses.

Áreas reflorestadas com algumas espécies de *Eucalyptus* spp sofrem modificações durante o desenvolvimento da cultura. Estas são visualizadas pela inibição do crescimento de espécies nativas e acúmulo de material orgânico não decomposto sobre o solo. Estudos realizados por Del Moral e Miller (1970) mostraram alterações na flora nativa em áreas reflorestadas com *Eucalyptus camadulensis*. As alterações foram atribuídas à presença de substâncias voláteis e solúveis em água, como por exemplo, os terpenos, adsorvidos às partículas coloidais do solo.

Sendo assim, o acúmulo de material orgânico não decomposto sobre os solos reflorestados com eucalipto tem sido atribuído à baixa atividade microbiana, causada pela presença de substâncias inibitórias no material em decomposição (FLORENZANO, 1957).

A presença de inibidores microbianos também foi constatada nos componentes alifáticos e aromáticos dos óleos essenciais do eucalipto (KURITA et al., 1981).

Um estudo realizado com folhas de duas espécies de árvores enterradas por 12 meses, em solo de Mata Atlântica e de eucaliptal com 40 anos de plantio, mostrou

diferenças no tempo de decomposição das folhas. No solo de Mata Atlântica foi observada uma perda de 30% de massa para as duas espécies de folhas (*Dalbergia nigra* e de *Eucalyptus grandis*) após 4 meses de decomposição, enquanto que no solo de eucaliptos o tempo necessário para 40% de perda foi de 8 meses (REZENDE et al., 2001).

Velasco e Lozano (1979) observaram uma diminuição da microbiota dos solos com eucalipto, quando comparados com bosque de Carvalho-vermelho (*Quercus robur*) resultando numa desaceleração do processo de decomposição da matéria orgânica do solo e num aumento da relação C/N da mesma. Portanto, as alterações geradas pelo cultivo de monoculturas de eucalipto (vegetação exótica) nos sistemas lacustres atuam inicialmente como distúrbio que pode ser assimilado pelos processos ecológicos ao longo do tempo, com alteração das inter-relações entre os elementos biológicos (diversidade), físicos e químicos, podendo afetar a estabilidade dos lagos (MORETTO, 2001).

2 – OBJETIVOS

O Capítulo I teve por objetivo avaliar, em laboratório, o efeito tóxico de substâncias liberadas com a decomposição de folhas de serapilheira de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* coletadas nas áreas de entorno das lagoas estudadas (Palmeirinha e Ferruginha), a partir de testes de toxicidade com cladóceros e macroinvertebrados bentônicos.

Para tanto, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Comparação do processo de decomposição das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* em laboratório;
- Avaliação da toxicidade da água de decomposição após 4, 7, 15 e 34 dias sobre os organismos-teste *Daphnia similis*, *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus xanthus*;
- Comparação do efeito de toxicidade das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*.

3 – MATERIAIS E METODOS

3.1 – Amostragem

Para a execução desta etapa do presente estudo, foram coletadas folhas das áreas de entorno das lagoas Palmeirinha e Ferruginha. O material coletado foi levado e mantido no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, para posterior utilização nos experimentos para avaliação da toxicidade da água de decomposição das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*.

3.2 – Decomposição em laboratório

Folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos experimentos de decomposição foram pesadas, colocando-se 3 g de folhas em béqueres de 500 mL (um béquer para cada espécie estudada), adicionando-se 500 mL de água de cultivo e plástico filme na superfície de cada um dos béqueres. Os mesmos foram mantidos em laboratório pelo período de 4, 7, 15 e 34 dias (Tabela 3) à temperatura ambiente. Os períodos considerados tiveram como base estudo realizado por Gonçalves Jr (2005). Durante esse período, foram observadas as alterações (coloração, película de óleo e odor) em cada um dos béqueres.

Tabela 3 – Decomposição em função do período (dias).

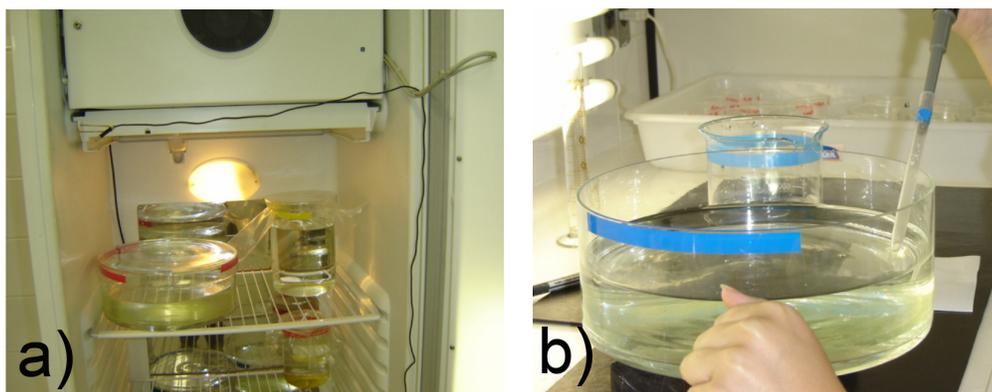
Decomposição	Período (dias)
1º	4
2º	7
3º	15
4º	34

Após os períodos de manutenção das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*, foram realizados os testes de toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis*, *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus xanthus*. Foram utilizadas as seguintes diluições: 100, 50 e 25% da água de decomposição, e o volume total utilizado para os cladóceros (*D. similis* e *C. silvestrii*) foi de 30 mL, para *D. laevis* o volume foi de 20 mL, e para o macroinvertebrado bentônico foi de 60 mL, esses volumes foram retirados dos béqueres que foram mantidos durante todo o período.

3.3 – Condições de cultivo

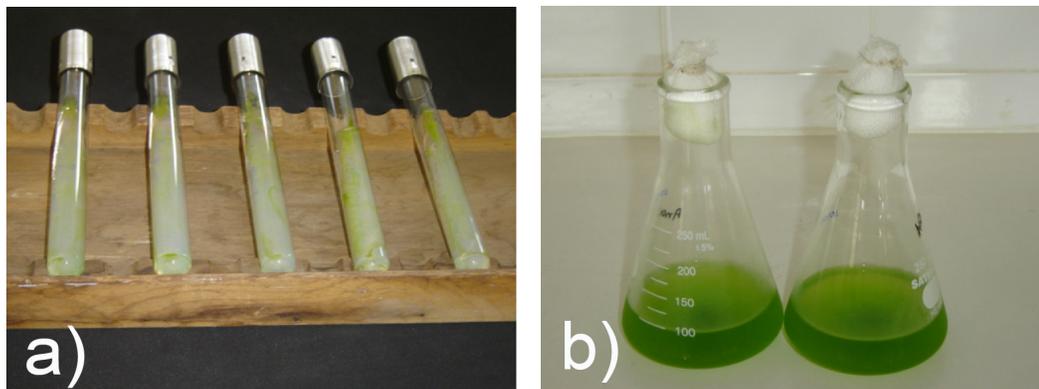
Daphnia similis e *D. laevis* foram mantida em lotes de até 50 adultos por litro (Figuras 13 - a), sendo adequado o recipiente de 1000 mL a 2000 mL, com fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux. e temperatura de 18 a 22°C, e 24 a 26°C, respectivamente. A água de cultivo foi renovada três vezes por semana, evitando-se diferença de temperatura maior que 2°C. No manuseio dos organismos foram utilizadas pipetas de diâmetro adequado ao tamanho dos mesmos, com borda arredondada (Figuras 13 - b) (ABNT, 2004).

O cultivo de *Ceriodaphnia silvestrii* foi bastante semelhante ao de *Daphnia*, onde as culturas foram mantidas em béqueres de dois litros, contendo aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sua capacidade com água de manutenção, iniciando-se a cultura com 100 organismos de aproximadamente 24 horas de idade (ABNT, 2005).



Figuras 13 – Cultivos de *Daphnia* spp e *Ceriodaphnia* spp mantidos em câmara incubadora (a) e manuseio das culturas (b). (Foto: Ana C. Zoratto).

As culturas de *Daphnia* e *Ceriodaphnia* foram alimentadas diariamente com *Pseudokirchneriella subcapitata* e alimento composto, um complemento alimentar a base de ração fermentada e fermento biológico. O cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Figuras 14), foi mantido a aproximadamente 22°C para crescimento durante uma semana e posterior repicagem. O meio foi preparado a partir das soluções da Tabela 1, utilizando volumes da Tabela 2, do Anexo I.



Figuras 14 – Etapas do cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ágar inclinado (a) e inóculo (b). (Foto: Ana C. Zoratto).

O alimento composto apresentou um teor de sólidos totais entre 2,5 e 3,1 g.L⁻¹. Seu preparo foi realizado misturando-se partes iguais de ração de peixe (mantida sob aeração durante uma semana) e fermento biológico. O preparo dessas soluções está descrito no Anexo I.

O cultivo de *Chironomus xanthus* (Figuras 15) foi feito em bandejas plásticas de 45x35x6 cm de tamanho contendo uma camada de areia esterilizada (substrato, esterilizado em autoclave a 120 atm, por 20 minutos) e 4 litros de água de manutenção. As bandejas foram mantidas sob aeração, com temperatura controlada (entre 23 e 25°C) e fotoperíodo de 12 horas. Para a retenção dos organismos adultos, as bandejas foram cobertas com gaiolas de nylon. Alimentação das larvas foi fornecida uma concentração de 10⁵ células.mL⁻¹ de algas (clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata*) apenas no primeiro dia, e ração para peixes Tetramim[®] na proporção de 0,04 mg. mL⁻¹ de água nos demais dias (FONSECA, 1997).



Figuras 15 – Cultivo de *Chironomus xanthus*: gaiolas de nylon (a) e bandejas mantidas sob aeração (b). (Foto: Ana C. Zoratto).

3.4 – Água de cultivo e testes de sensibilidade

A água de cultivo e de diluição foi natural, sendo utilizada para a manutenção de culturas e realização dos testes de sensibilidade. Esta água é proveniente de uma fonte situada no bairro Cidade Nova em Belo Horizonte, a qual é monitorada e também utilizada pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, com valores de pH de 6,5 (ajustado para 7,0 através de aeração), dureza total de 36-40 mg CaCO₃. L⁻¹ e condutividade de aproximadamente 140,0 uS.cm⁻¹, os quais estão próximos aos estabelecidos pela ABNT (2004).

Mensalmente foram realizados testes de sensibilidade para avaliação das condições fisiológicas dos organismos-teste, utilizando cloreto de sódio (NaCl) e dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) para os cladóceros e cloreto de potássio (KCl) para os macroinvertebrados, com a exposição de no mínimo 20 organismos-teste distribuídos em pelo menos duas replicatas, por concentração das substâncias de referência utilizadas no caso de cladóceros e 10 organismos-teste por concentração de KCl utilizada para *C. xanthus*. Estas foram mantidas nas mesmas condições de manutenção das culturas e sem alimentação, por um período de 48 horas, no caso de cladóceros e de 96 horas com alimentação apenas inicial, no caso de quironomídeos. Após esse período, foram efetuadas as leituras dos testes, sendo anotado o número de organismos móveis.

O lote de água de diluição foi considerado aceitável para uso quando a porcentagem de imobilidade dos organismos não excedeu 10% do valor total (ABNT, 2004).

3.5 – Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade aguda para avaliação dos efeitos biológicos da água de decomposição de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* foram realizados após os períodos de 4, 7, 15 e 34 dias de decomposição das folhas.

A metodologia utilizada nos testes de toxicidade seguiu as normas estabelecidas pela ABNT (2004) para *Daphnia similis* e *D. laevis* e ABNT (2005) para *Ceriodaphnia silvestrii*. No caso de *Chironomus xanthus* adotou-se a metodologia recomendada pela USEPA (1994), em que se utiliza a proporção de 1:4 sedimento/água, além do uso apenas das águas de decomposição, sem adição de sedimento. Para estes testes foram utilizadas larvas na fase de desenvolvimento (instar III).

O número de organismos utilizados nos testes com os cladóceros foram de 20 a 30 organismos-teste por concentração, essa variação na quantidade de organismo ocorreu em função da disponibilidade no momento da realização dos testes.

A duração dos experimentos foi de 48 horas no caso de cladóceros e de 96 horas no caso de macroinvertebrados bentônicos. Decorrido este período, foram feitas as contagens dos organismos vivos e mortos, visando à obtenção da porcentagem de organismos vivos e mortos nas concentrações de 100, 50 e 25%. Para *C. xanthus*, além do uso da água de decomposição nestas diferentes concentrações, incluiu-se uma tréplica sem diluição (concentração de 100%), contendo sedimento na proporção de 1:4.

3.6 – Monitoramento de variáveis químicas nos testes de toxicidade

Ao início e final dos testes de toxicidade, foram feitas medidas de oxigênio dissolvido (OD), pH, condutividade e dureza da água, de acordo com o STANDARD METHODS (APHA, 2005). Para a análise de OD, foram feitas leituras diretas em oxímetro Digimed modelo DM-4 e para o pH, foram feitas leituras em potenciômetro Digimed modelo DM-20. No caso da condutividade, foi utilizado um condutímetro Digimed modelo DM-31 e para as análises de dureza, foi determinada a dureza total por titulometria.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Diferenças visuais observadas nas águas de decomposição das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

Visualmente, as folhas das duas espécies de *Eucalyptus* coletadas nas áreas de entorno das lagoas estudadas (Palmeirinha e Ferruginha), possuem diferenças morfológicas, sendo que as folhas de *E. urophylla* possuem maior espessura comparada às folhas de *E. grandis*.

Inicialmente (após 2 dias), foi observada diferença na coloração da água que estava em contato com as folhas de *E. grandis*, a qual adquiriu uma coloração amarelada, enquanto que a água em contato com *E. urophylla*, visualmente, não apresentou modificações.

Durante o período de 4, 7, 15 e 34 dias em que permaneceram em contato com a água no laboratório, observou-se que *E. grandis* adquiriu uma coloração mais intensa provavelmente devido à liberação de uma maior concentração de substâncias naturais na água em função da espessura das folhas e do tipo de substâncias presentes nas mesmas (substâncias mais polares – Capítulo III) (Figura 16).

Foi observada também a formação de uma película oleosa na superfície da água que estava em contato com as folhas de *E. grandis*, não observada na água de decomposição das folhas de *E. urophylla*.

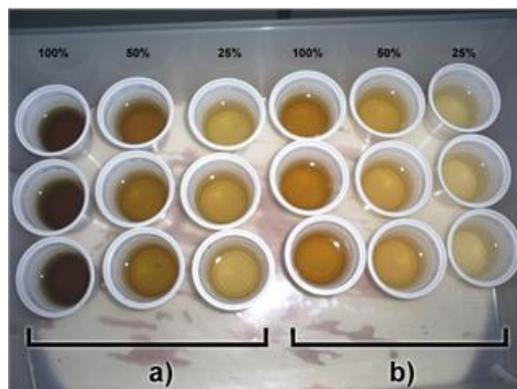


Figura 16 – Diferenças na coloração da água nos experimentos de decomposição utilizando *E. grandis* (a) nas concentrações 100, 50 e 25% e *E. urophylla* (b) nas mesmas concentrações. (Foto: Ana C. Zoratto).

Provavelmente essas diferenças (coloração e película de óleo), particularmente no período de até 15 dias, ocorreram em função de características morfológicas das folhas de *E. grandis* (menor tamanho e menor espessura), o que pode ter facilitado a ação de organismos decompositores. Outra possível explicação foi uma maior concentração de substâncias naturais, possivelmente mais polares que as encontradas em *E. urophylla*. Até o período de 34 dias, as águas das duas espécies de eucaliptos permaneceram com coloração e película de óleo nas superfícies e com aspecto quebradiço.

A decomposição de material vegetal envolve pelo menos quatro grupos distintos de microrganismos: celulolíticos, hemicelulolíticos, pectinolíticos e ligninolíticos. A degradação de um substrato complexo, folhas, tecidos microbianos mortos ou exoesqueletos de insetos é processada mais rapidamente na presença de uma comunidade microbiana do que na presença de uma única população (TAUK, 1990).

A colonização das folhas de eucalipto por hifomicetos aquáticos é imediata após imersão. A densidade de esporos produzidos por este tipo de folhas em decomposição são elevadas e similares as de folhas caducifólias de espécies nativas (BARLOCHER et al., 1995); no entanto, a produção de esporos nas folhas de eucaliptos parece ser retardada em cerca de 1 a 2 semanas em relação a folhas típicas de espécies nativas de zona ripária. Este retardo tem sido confirmado por

diversos autores e parece estar relacionado, em primeiro lugar, a uma barreira física das folhas, a presença de uma cutícula de difícil degradação. Esta camada determina não só a lenta perda dos fenóis e taninos solúveis das folhas, capazes de inibir a colonização microbiana (BARLOCHER op. cit; CANHOTO e GRAÇA, 1999), como também dificulta o acesso das hifas dos fungos ao mesófilo da folha e eventual liberação de esporos.

As folhas de eucaliptos possuem baixo teor de nutrientes como nitrogênio e fósforo, enquanto que os teores de compostos de difícil degradação como: lignina, óleos (1,9 a 2,7% do peso foliar), taninos e compostos fenólicos (6 a 11% do peso seco foliar) são elevados; há ainda a presença de uma espessa cutícula coberta por uma camada de cera quimicamente complexa que isola as folhas de eucaliptos (BUNN, 1988; EDWARDS e WANJURA, 1990; EDWARDS et al., 1993; POZO et al., 1998; CANHOTO, 2001).

As taxas de decomposição das folhas de eucaliptos dão uma indicação sobre a velocidade com que os nutrientes ficam disponíveis para os produtores, incluindo algas e outras plantas aquáticas. Estudos realizados em Portugal indicam que as folhas de eucalipto se degradam a uma taxa muito mais lenta que as folhas de espécies de zona ripária como o amieiro, perdendo cerca de 50% da sua massa após 74 dias de imersão, com taxa de decomposição equivalente a $0,068 \text{ K.dia}^{-1}$. (ABELHO e GRAÇA, 1996; CANHOTO e GRAÇA, 1996).

4.2 – Testes de toxicidade após 4 dias de decomposição das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

As águas em que foram mantidas as folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após o período de 4 dias foram utilizadas nos testes de toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis*, *D. laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus xanthus*, utilizando as concentrações de 100, 50 e 25% para *E. grandis* e *E. urophylla*.

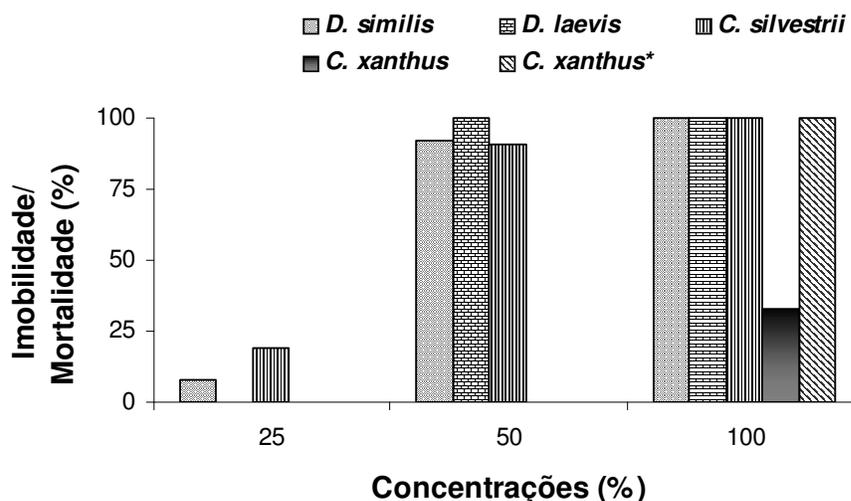
No caso dos testes realizados com a água das folhas de *E. grandis* da primeira decomposição utilizando o organismo-teste *D. similis*, a concentração de 100%

apresentou imobilidade de todos os organismos testados, já na concentração de 50%, a porcentagem total de organismos imóveis foi de 92% e na menor concentração a imobilidade observada foi de apenas 8% do total de organismos testados (Figura 17).

Para *Daphnia laevis*, nas concentrações de 100% e de 50% verificou-se 100% de imobilidade sendo que em 50% verificou-se maior efeito de toxicidade em relação à *D. similis*. Por outro lado, não foi observada imobilidade na menor.

Para *Ceriodaphnia silvestrii*, na maior concentração, houve imobilidade de todos os organismos testados. Na concentração de 50%, a imobilidade observada foi de aproximadamente 91% do total de organismos utilizados no teste, enquanto na concentração de 25% apenas 19% dos indivíduos apresentaram imobilidade (Figura 17).

Quanto a *Chironomus xanthus*, verificou-se que na concentração de 100% na ausência de sedimento, houve mortalidade de todos os organismos-teste, enquanto na mesma concentração na presença de sedimento, houve mortalidade de aproximadamente 33% do total de organismos testados. Já nas concentrações de 50 e 25%, não foi observada mortalidade.



*Concentração de 100% sem utilização de sedimento.

Figura 17 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da primeira decomposição das folhas de *E. grandis* em laboratório.

Nos testes de toxicidade com a água da primeira decomposição das folhas *E. urophylla* utilizando *D. similis* e *D. laevis* não verificou-se efeito de toxicidade em todas as concentrações testadas (Figura 18).

Já no caso da *C. silvestrii*, a maior concentração apresentou imobilidade de aproximadamente 90% do total de organismos utilizados, enquanto que nas concentrações de 50 e 25% a imobilidade observada foi de 73 e 63% respectivamente. Para *C. xanthus* não foi observado efeito de toxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

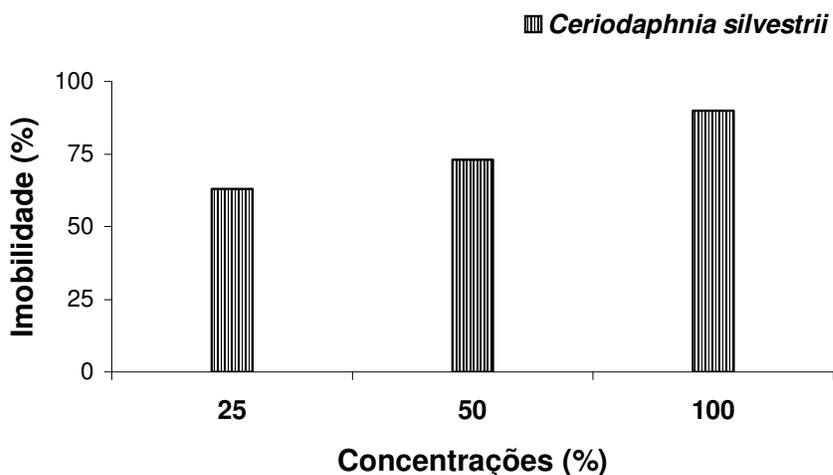


Figura 18 – Imobilidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da primeira decomposição das folhas de *E. urophylla* em laboratório.

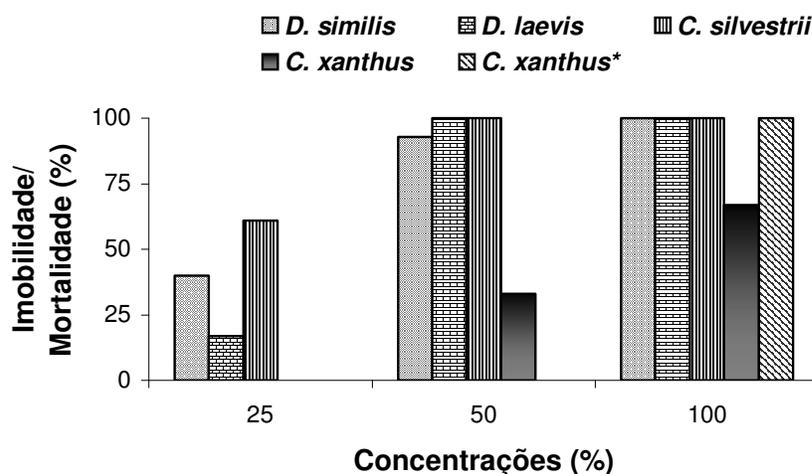
4.3 – Testes de toxicidade após 7 dias de decomposição das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

Foi considerada como segunda decomposição, a água mantida pelo período de 7 dias em contato com as folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*, a qual foi em seguida utilizada nos testes de toxicidade aguda com os mesmos organismos-teste, volumes e concentrações do primeiro período de decomposição.

Para *D. similis* verificou-se imobilidade de todos os organismos na maior concentração da água de decomposição de *E. grandis*, enquanto nas concentrações de 50 e 25% a imobilidade observada foi de 93 e 40%, respectivamente (Figura 19).

Para *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii* observou-se imobilidade de todos os organismos nas concentrações de 100 e 50% da água de decomposição; já na menor concentração, houve imobilidade de aproximadamente 17% para *D. laevis* e 61% para *C. silvestrii* (Figura 19).

Quanto a *Chironomus xanthus*, na água de decomposição a 100% houve mortalidade de todos os organismos-teste nas réplicas sem sedimento, enquanto que nas réplicas com sedimento nesta mesma concentração verificou-se 67% de mortalidade. Na concentração de 50%, houve mortalidade de 33% dos organismos enquanto na de 25% não houve mortalidade.



*Concentração de 100% sem utilização de sedimento.

Figura 19 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da segunda decomposição das folhas de *E. grandis* em laboratório.

No caso de *E. urophylla*, os testes com *D. similis* e *C. silvestrii* mostraram maior imobilidade nas concentrações 25 e 50% do que na concentração de 100% da água de decomposição. No caso de *D. similis*, na concentração de 100% apenas 11% dos organismos apresentaram imobilidade, enquanto que nas concentrações de 50 e 25% a imobilidade observada foi de 17 e 16% respectivamente (Figura 20).

Para *C. silvestrii*, na maior concentração não foi verificada imobilidade e nas concentrações de 50 e 25% houve imobilidade de aproximadamente 94 e 100% do

total de organismos-teste (Figura 20). Quanto a *D. laevis* e *C. xanthus* não foi verificada imobilidade e mortalidade, respectivamente, em nenhuma das condições experimentais.

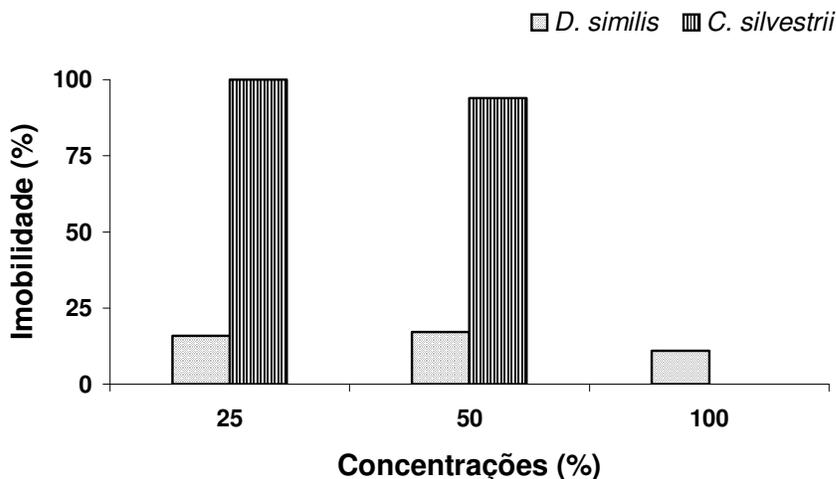


Figura 20 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da segunda decomposição das folhas de *E. urophylla* em laboratório.

4.4 – Testes de toxicidade após 15 dias de decomposição das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

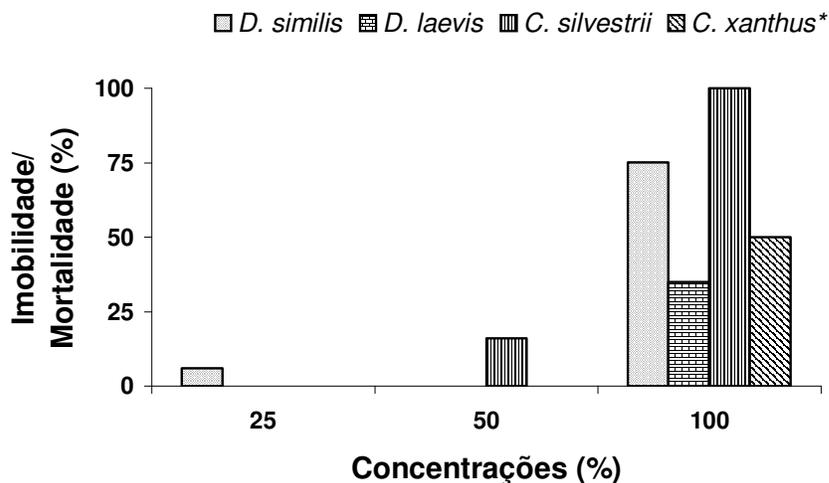
No terceiro período de decomposição (após 15 dias), verificou-se no caso de *D. similis*, imobilidade de 75% do total de organismos na maior concentração, enquanto na concentração de 50%, não foi observada imobilidade.

Na menor concentração (25%), houve imobilidade de aproximadamente 6% dos organismos testados (Figura 21).

Para *D. laevis* foi verificado menor efeito de toxicidade comparado a *D. similis*, uma vez que na água de decomposição na concentração de 100% apenas 35% do total de organismos testados apresentaram imobilidade.

Nas duas outras concentrações (50 e 25%) não foi observada imobilidade. *C. silvestrii* apresentou imobilidade de 100% na maior concentração (100%), enquanto que nas concentrações de 50% e 25%, verificou-se imobilidade de 16% e ausência de imobilidade dos organismos, respectivamente (Figura 21).

Nos testes com *Chironomus xanthus*, verificou-se 50% de mortalidade dos organismos na concentração 100% nas réplicas sem sedimento, enquanto nas com sedimento não houve mortalidade, o mesmo tendo sido verificado nas concentrações de 50 e 25%.



*Concentração de 100% sem utilização de sedimento.

Figura 21 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da terceira decomposição das folhas de *E. grandis* em laboratório.

No caso de *E. urophylla*, para *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*, não foi observada imobilidade em nenhuma das concentrações testadas, enquanto para *C. silvestrii* houve imobilidade apenas na concentração de 100%, correspondente a 33% (Figura 22).

No caso de *C. xanthus* não foi observada mortalidade nas concentrações de 100 e 25%. Apenas na concentração de 50% foi observada mortalidade de 50% do total de organismos testados.

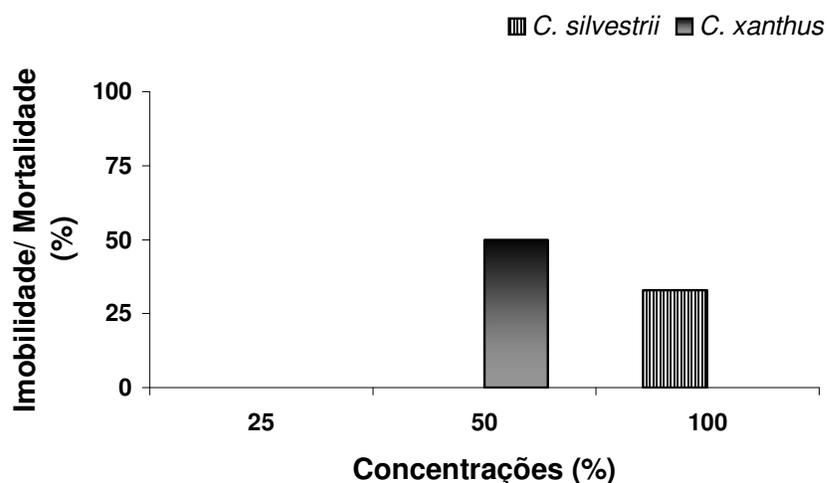


Figura 22 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da terceira decomposição das folhas de *E. urophylla* em laboratório.

De maneira geral, verificou-se que nos períodos iniciais (4 e 7 dias) de decomposição ocorreu uma maior porcentagem de imobilidade e mortalidade dos organismos-teste, provavelmente em função das substâncias liberadas na fase inicial de decomposição, causando maior efeito tóxico.

Segundo Tauk (1990), no solo, a decomposição inicial de material lábil ocorre rapidamente e posteriormente um processo mais lento de decomposição de materiais mais resistentes. Essa lenta decomposição pode ser consequência do mecanismo de adsorção, à estabilização de metabólicos e à queda da taxa de biomassa no solo.

Isso pode ser observado no meio ambiente através de estudo realizado por Abelho e Graça (1996), em ribeirões ladeados por eucaliptais que constataram que a matéria orgânica grosseira retida no leito dos mesmos foi quantitativamente superior comparada a ribeirões rodeados por florestas caducifólias.

4.5 – Testes de toxicidade após 34 dias de decomposição das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

Após 34 dias em contato com água em laboratório (quarta decomposição), no teste realizado com *E. grandis* utilizando *Daphnia similis*, verificou-se menor efeito tóxico da água comparado aos outros testes realizados com água de decomposição de 4, 7 e 15 dias. Nesse caso, houve imobilidade de apenas 40% dos organismos-teste na maior concentração, e de 15% nas concentrações 50 e 25% (Figura 23).

Para *D. laevis*, houve imobilidade de 29% na maior concentração e de 44% na concentração de 50%, enquanto na menor concentração não foi observada imobilidade.

Os organismos *C. silvestrii* e *C. xanthus* não apresentaram imobilidade e mortalidade, respectivamente, em nenhuma das concentrações testadas.

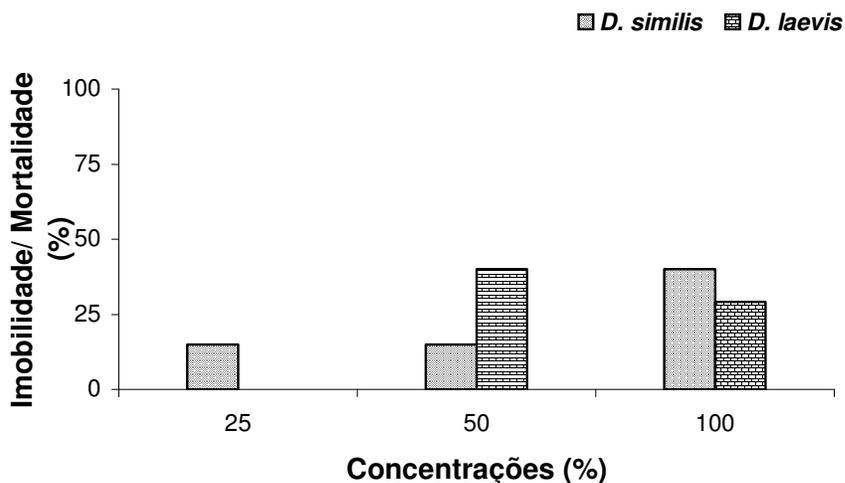


Figura 23 – Imobilidade/ mortalidade dos organismos-teste nas concentrações de 100, 50 e 25% da quarta decomposição das folhas de *E. grandis* em laboratório.

Nos testes realizados com *E. urophylla* não foi verificada imobilidade em nenhuma das condições experimentais tanto para *D. similis* quanto para *D. laevis*.

Possivelmente, as substâncias tóxicas de *E. urophylla* sejam liberadas em outros estágios da decomposição, incluindo substâncias apolares não liberadas quando em contato com a água.

No caso de *C. silvestrii*, o resultado do teste foi desconsiderado tanto para *E. grandis* como para *E. urophylla*, porque todos os organismos testados apresentaram imobilidade, incluindo o controle. Quanto a *C. xanthus* não foi verificado efeito de toxicidade para nenhuma das duas espécies de eucaliptos estudada.

No geral, pode-se observar que *E. grandis* apresentou maior efeito de toxicidade aguda aos organismos testados do que *E. urophylla*, possivelmente em função da espessura das folhas de *E. grandis* que são mais finas e da maior taxa de decomposição por microorganismos em relação às folhas de *E. urophylla*. Outra possível explicação para esse maior efeito tóxico de *E. grandis*, é a maior presença de substâncias polares em suas folhas, que são liberadas facilmente quando em contato com a água através da decomposição.

A decomposição microbiana das folhas é fundamentalmente efetuada por um grupo heterogêneo de fungos, os hifomicetos aquáticos, que dominam as fases iniciais da decomposição, podendo atingir de 8 a 18% da massa total foliar (GESSNER e CHAUVET et al., 1994). Com isso, há um aumento no valor nutritivo das folhas estimulando o seu consumo pelos invertebrados (CUMMINS, 1985), que desempenham um papel fundamental na conversão de partículas grosseiras de matéria orgânica em partículas finas que servem de alimento a outros grupos detritívoros como os “coletores” e os “filtradores”.

Por esse motivo, a vegetação da zona ripária é uma componente importante da biodiversidade e funcionalidade dos ecossistemas (CANHOTO et al., 2002). Como exemplo, trabalhos recentes indicam que a substituição intensiva da floresta caducifolia mista por monoculturas de *E. globulus* promove modificações estruturais e funcionais não só no solo (GAMA et al., 1989; FERREIRA et al., 2000) como também no ambiente aquático (MOLINA et al., 1991; POZO et al., 1998; GRAÇA et al., 2002). Segundo Abelho e Graça (1996), a biodiversidade de hifomicetos e insetos aquáticos diminuem nos ribeirões portugueses ladeados por eucaliptos.

Ácidos fenólicos e outras substâncias solúveis em água, liberados pela decomposição das plantas, podem inibir ou estimular o desenvolvimento da microbiota, de acordo com a sua concentração no ambiente (KNOSEI apud DELLA BRUNA et al., 1989).

Provavelmente as substâncias polares presentes nas folhas de *Eucalyptus* sejam as responsáveis pelas baixas concentrações de nutrientes presente nas lagoas estudadas, pois essas substâncias mesmo em pequenas concentrações apresentam efeitos tóxicos aos organismos presentes no ambiente aquático diminuindo assim as taxas de decomposição nesses ambientes.

Estudo realizado por Wellbaum et al. (1998), mostrou que áreas reflorestadas com *Eucalyptus* spp possuem quantidades elevadas de material orgânico não decomposto, resultante da baixa atividade microbiana causada pela presença de substâncias inibitórias do crescimento e atividade da microbiota no material em decomposição (DELLA BRUNA et al. 1989), aliando-se ao fato de que as folhas de *Eucalyptus* spp liberam diversas substâncias hidrossolúveis durante a decomposição (DELLA BRUNA et al. 1991).

Segundo Singh e Gupta (1977), a taxa de decomposição varia com a quantidade de substâncias solúveis em água e lixiviáveis e com o conteúdo de nitrogênio e polifenóis presentes na serapilheira. Os componentes da serapilheira, solúveis em água, constituem fontes de energia prontamente disponíveis para os decompositores, as quais influenciam os estágios iniciais da decomposição. Essas substâncias desaparecem rapidamente da matéria orgânica devido à utilização microbiana e a lixiviação (SINGH e GUPTA, op. cit). Neste contexto, um estudo realizado por Knosel apud Della Bruna (1989) mostrou que substâncias hidrossolúveis são inibitórias em altas doses e estimulantes em pequenas doses.

4.6 – Validade dos testes

Os resultados de todos os ensaios mantiveram-se dentro do percentual adotado para imobilidade ou mortalidade, verificando-se 100% de sobrevivência dos organismos.

5 – CONCLUSÕES

1. A menor espessura das folhas de *E. grandis* indicou maior velocidade no processo de decomposição e liberação de compostos na água;
2. *E. grandis* apresentou maior efeito de toxicidade aguda para os cladóceros *D. similis*, *D. laevis* e *C. silvestrii*, da água de decomposição testada após 4 dias e principalmente após 7 dias, indicando liberação de substâncias tóxicas das folhas de serapilheira quando em contato com a água;
3. A partir do terceiro e quarto períodos de decomposição das folhas de *E. grandis* (15 e 34 dias, respectivamente), os efeitos de toxicidade aguda observados para cladóceros foram menores que nos dois primeiros períodos de decomposição, indicando que as substâncias com caráter tóxico já haviam sido liberadas nos primeiros períodos de decomposição. Os resultados dos testes demonstraram que o efeito tóxico de *E. grandis* aumentou do primeiro (4 dias) para o segundo período de decomposição (7 dias); após esse período, houve diminuição ou mesmo ausência de efeito tóxico;
4. Para o macroinvertebrado bentônico *Chironomus xanthus*, também foi observada maior mortalidade de organismos nos testes realizados com água de decomposição das folhas de *E. grandis*, após 7 dias, provavelmente em função das substâncias liberadas nesse período;
5. Para *E. urophylla* não foi observado efeito tóxico nas etapas de decomposição (4, 7, 15 e 34 dias) com *D. similis*, *D. laevis* e *Chironomus xanthus*, apenas para *Ceriodaphnia silvestrii* verificou-se efeito de toxicidade, provavelmente essa ausência de efeito de toxicidade nas primeiras etapas da decomposição seja em função da morfologia das folhas (maior espessura em relação a *E. grandis*) e presença de substâncias de difícil degradação.

CAPITULO II

“Extração, identificação e avaliação ecotoxicológica do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*”.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Óleos essenciais

A denominação de óleo essencial refere-se a um grupo de substâncias naturais aromatizantes que são extraídas de diversos componentes de alguns vegetais, segundo processo específico. São constituídos de numerosos compostos voláteis, freqüentemente envolvendo de 50 a 100 ou até mais componentes isolados, com tensões de vapor elevadas, odoríferas, insolúveis em água, porém solúveis em álcool e em vários solventes imiscíveis na água (BRAGA, 1971). Dentre os grupos químicos, os óleos essenciais apresentam hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres (VITTI e BRITO, 1999).

A aplicação dos óleos essenciais pelo homem vem de tempos antes de Cristo. Civilizações japonesas, chinesas e egípcias usavam como incenso para mortos, embalsamamento e como matéria prima para perfumes. Nos tempos atuais, os óleos essenciais possuem aplicação em diversas áreas, sendo constituinte primário ou secundário da indústria de perfumes, medicamentos, indústria química, como combustíveis, conservantes, inseticidas, entre outros (ROMANI, 1972; CINIGLIO, 1993).

De acordo com a sua consistência, os óleos essenciais se classificam em essências fluidas, bálsamos e óleos-resinas. As essências fluidas são líquidos voláteis à temperatura ambiente. Os bálsamos são de consistência mais espessa, pouco voláteis à temperatura ambiente e propensos a sofrerem reações de polimerização. As óleo-resinas têm o aroma das plantas em forma concentrada e são tipicamente líquidos muito viscosos ou substâncias semi-sólidas (GUENTHER, 1972).

A cultura do eucalipto para extração de óleos essenciais representa uma fonte importante de divisas, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais, juntamente com Austrália, Portugal e Espanha (VITTI e BRITO, 1999).

A produção deste óleo no Brasil em 1995 foi de aproximadamente 1000 toneladas anuais, com uma grande parcela destinada à exportação (90%). Estima-se que no início dos anos 90, a produção mundial tenha sido de aproximadamente 5000 toneladas ano (VITTI e BRITO, op. cit).

Em eucaliptos, os óleos essenciais ocorrem principalmente nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas. Estas glândulas encontram-se distribuídas em todo o parênquima foliar da maioria das espécies de eucalipto. A biossíntese dos óleos essenciais de eucalipto está relacionada com o seu metabolismo secundário, que não é considerado fundamental para a manutenção da vida do organismo e confere às plantas a capacidade de adaptação às condições do meio em que vive (BOLAND et al., 1991; CHAIBI et al., 1997; OYEDEJI et al., 1999).

Segundo Prates et al. (1998a), o 1,8-cineol ou eucaliptol é um produto natural produzido no metabolismo secundário de plantas e é um constituinte também do óleo essencial das folhas de várias espécies de *Eucalyptus*. A concentração dessa substância nas folhas de eucalipto pode ser bem maior que a presente no capim-gordura, variando bastante com a espécie: *Eucalyptus citriodora* (55%), *Eucalyptus globulus* (71%), *Eucalyptus punctata* (66%), *Eucalyptus maculata* (51%), *Eucalyptus maidesii* (70%), *Eucalyptus smithii* (84%) e outros (CHALCHAT et al., 1997). De acordo com Prates et al., (1998b), o monoterpeneo 1,8-cineol presente no óleo essencial do capim-gordura a uma concentração de 10,6%, é capaz de matar 100% das larvas do carrapato *B. microplus* em 5 minutos.

No caso do eucalipto, particularmente, a ocorrência do óleo essencial pode estar relacionada com a defesa da planta contra insetos, resistência ao frio quando no estágio de plântulas, ao efeito alelopático e à redução da perda de água (DORAM, 1991).

As folhas de eucaliptos contêm grandes quantidades de óleos essenciais não consumíveis ou mesmo venenosos, que conferem um certo grau de proteção contra a herbívora. Somente animais especializados como o marsupial *Phascolarctos cinereus*

(Diprotodontia: Phascolarctidae) ou larvas de mariposas da família Oecophoridae (Lepidoptera) podem usar as folhas de eucaliptos como fonte de alimento (COMMON, 1990). Na Austrália, há cerca de 1850 espécies descritas de Oecophoridae (COMMON, 1994).

Contudo, a fauna diversa de Oecophoridae naturalmente existe exclusivamente na Austrália, onde os eucaliptos são nativos. Ainda segundo Common (1981, 1990), a radiação evolutiva de Oecophoridae está ligada com a utilização da diversificada família Myrtaceae, particularmente das folhas secas persistentes de eucaliptos, pelas mariposas.

Os óleos de eucaliptos constituem uma das defesas mais eficazes da folha, mesmo após senescência e imersão, sendo que a ação dos óleos de eucalipto (majoritariamente constituídos por cineol e pineno) parece ser determinante na decomposição. Testes *in vitro* indicam que os óleos de eucaliptos têm uma elevada capacidade tóxica e/ou inibidora do crescimento de várias espécies de fungos, e das atividades enzimáticas dos mesmos (CANHOTO, 2001), daí a necessidade de se avaliar os efeitos dos óleos em ambientes aquáticos.

2 – OBJETIVOS

O Capítulo II aborda a extração de óleo essencial das folhas da serapilheira e de folhas mantidas por 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha (*Eucalyptus grandis*) e Ferruginha (*Eucalyptus urophylla*), e o efeito das duas espécies de eucaliptos sobre a biota aquática, na área de entorno de dois lagos do Sistema do Vale do rio Doce.

Para tanto, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- extração de óleo essencial através da técnica de destilação de arraste por vapor de água;
- análise do rendimento de óleo de cada espécie estudada e a identificação das substâncias que compõem os óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla* através de análise cromatográfica (Cromatografia Gasosa – CG).
- avaliação do efeito do óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla* sobre os organismos-teste *Daphnia similis* e *Daphnia laevis* visando fornecer subsídios para o monitoramento de ecossistemas aquáticos em áreas de plantio de eucaliptos.

3 – MATERIAIS E METODOS

3.1 – Período e frequência de amostragem

Para este estudo foram considerados dois períodos de coleta, incluindo a coleta de folhas de eucaliptos da serapilheira e das mesmas depois de mantidas em contato com a água nas lagoas estudadas por um período de 30 e 60 dias, visando a extração e a identificação de constituintes químicos e a realização de testes de toxicidade aguda com o material extraído. O período de permanência de 30 e 60 dias em contato com as lagoas foi adotado devido às etapas de decomposição, estando relacionado às informações consideradas no Capítulo I.

O primeiro período de coleta ocorreu entre os meses de outubro e dezembro/ 2005, caracterizado por elevadas temperaturas, coincidindo com o início das chuvas. Já o segundo período de coleta correspondeu aos meses de abril e julho/ 2006, com temperaturas menos elevadas e menor precipitação.

3.2 – Preparo dos *Litter-Bags* para manutenção nas lagoas

As folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* processadas para a obtenção de óleos essenciais foram coletadas nas áreas de entorno das lagoas Palmeirinha e Ferruginha. Parte das folhas obtidas foi imediatamente processada para a extração de óleos essenciais (item 3.3) e outra parte mantida em *litter-bags* de dois tamanhos diferentes (Figuras 24). Nos *litter-bags* maiores foram colocados 30g de folhas secas e nos menores 5g, sendo consideradas 4 e 20 réplicas, respectivamente. Foram utilizados dois tamanhos diferentes de *litter-bags* devido à disponibilidade dos mesmos e a necessidade de uma maior quantidade de folhas (massa) para as extrações. Após a pesagem, os *litter-bags* foram colocados em contato com a água das duas lagoas, pelo período de 30 e 60 dias. Posteriormente, assim como no caso das folhas de serapilheira prontamente processadas, foi feita a extração do óleo essencial das duas espécies de eucaliptos, utilizando a técnica de destilação por arraste a vapor de água nas folhas já secas e trituradas, descrita a seguir.



Figuras 24 – Pesagem das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (a) e *litter-bags* prontos para serem colocados nas lagoas (b). (Foto:Arnola Cecila Rietzler).

3.3 – Extração do óleo essencial

Os métodos de extração de óleo essencial variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo, sendo que os métodos mais comuns são: enfloração, destilação por arraste de vapor d' água; extração com solvente orgânico de forma contínua e descontínua; prensagem/ expressão e extração por CO₂ supercrítico (GUENTER, 1977; ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

O método de destilação de arraste por água é o mais simples e consiste em um reservatório (dorna no caso de indústrias e balão de destilação no caso de laboratório) onde a matéria prima é colocada juntamente com água. Este reservatório é ligado a um condensador por onde há fluxo de água para refrigeração. A mistura água e matéria prima são aquecidas diretamente. O vapor produzido na destilação condensa-se no condensador e é recolhido. A separação se faz facilmente pelo fato do óleo e água não serem miscíveis.

No método de destilação com arraste a vapor sob baixa pressão o aquecimento da matéria prima não é feita de forma direta, mas sim, indiretamente, por passagem de vapor de água pela matéria prima.

Na Figura 25 pode ser visto um esquema para destilação de óleo por arraste a vapor (Sistema Clevenger). A matéria-prima (folhas) contendo óleo a ser extraído é colocada no destilador que contém fundo coberto com tela de aço inox (Figura 26).

O vapor proveniente de uma caldeira passa pelo material vindo da parte inferior e arrasta o material destilável que é condensado no condensador. O material destilado é então separado no funil de separação (CINIGLIO, 1993; VITTI e BRITO, 1999).

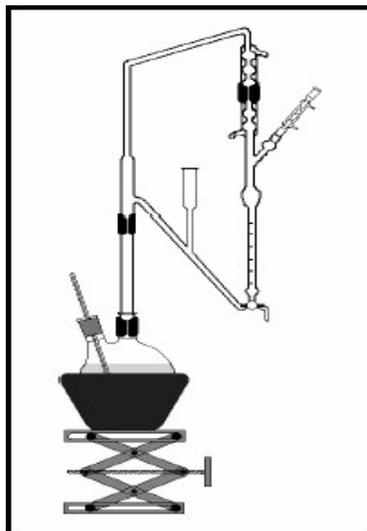


Figura 25 – Sistema Clevenger para extração de óleo essencial.

Fonte: GIRARD, 2005. Acesso: 27 de maio de 2007.



Figura 26 – Destilação de folhas de *Eucalyptus* - Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG. (Foto: Fabíola Lino de Araújo).

3.3.1 – Etapas da extração do óleo essencial

As destilações dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Fitoquímica da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, conforme o fluxograma (Figura 27).

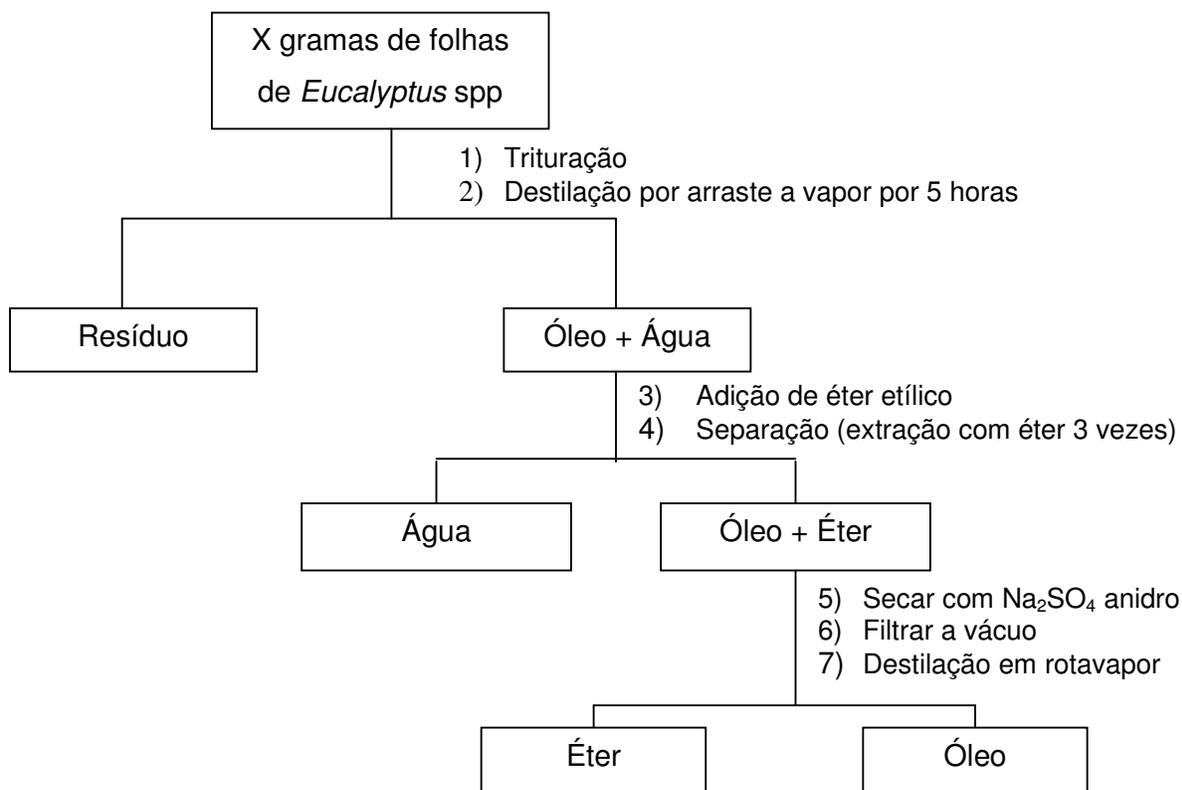


Figura 27 – Fluxograma das etapas de extração do óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla*.

Como material vegetal, foram utilizadas folhas secas (serapilheira), e secas após exposição em *litter-bags* nas lagoas por 30 e 60 dias. Na primeira etapa de extração de óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla*, realizada a partir do mês de outubro de 2005, foram utilizadas as massas de folhas expressas na Tabela 4, juntamente com o volume de 1800 mL de água.

Tabela 4 – Massa (g) de folhas utilizadas na extração do óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla* em função do tempo – primeira etapa de extração.

Espécie	Massa (g)		
	Inicial	30 dias	60 dias
<i>E. grandis</i>	126,0	50,0	75,8
<i>E. urophylla</i>	126,6	48,4	71,6

As diferenças entre as massas iniciais, 30 e 60 dias ocorreram em função da disponibilidade de material e a dificuldade em se manter as folhas em contato com as lagoas pelos períodos de 30 e 60 dias.

Na segunda etapa de extração dos óleos essenciais, a partir de abril de 2006, a metodologia foi à mesma que a utilizada na primeira etapa, e a massas (g) utilizadas estão expressas na Tabela 5.

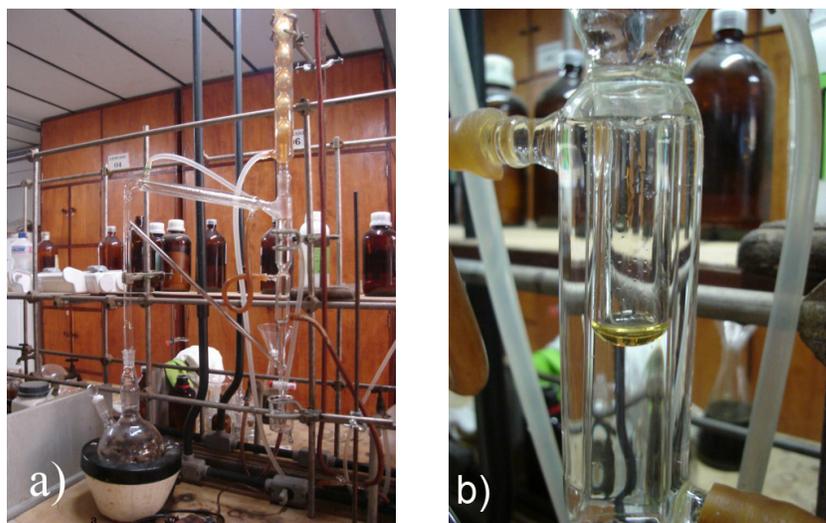
Tabela 5 – Massa (g) de folhas utilizadas na extração do óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla* em função do tempo – segunda etapa de extração.

Espécie	Massa (g)		
	Inicial	30 dias	60 dias
<i>E. grandis</i>	204,1	65,1	65,8
<i>E. urophylla</i>	301,4	76,0	71,7

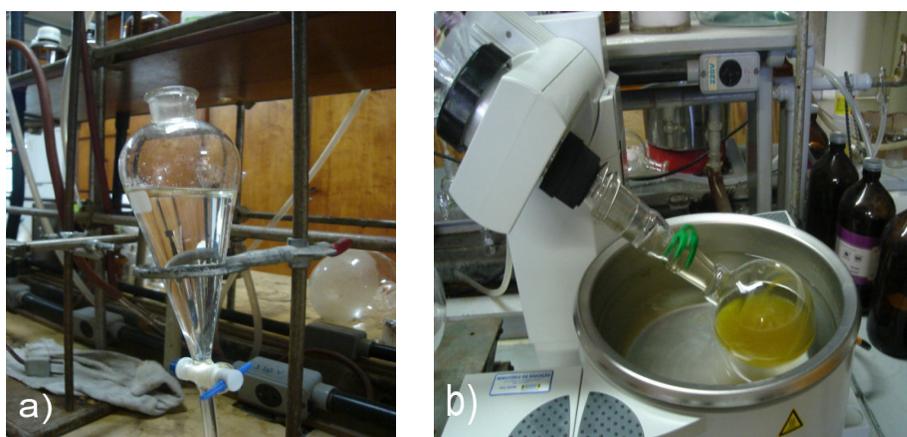
As extrações dos óleos essenciais foram realizadas utilizando o método de destilação por arraste com vapor d'água em aparelho tipo Clevenger. O material seco e triturado foi colocado no balão volumétrico do destilador juntamente com água a temperatura de 80 °C (Figuras 28).

O tempo de extração foi de aproximadamente 5 horas para cada amostra. O hidrolato foi extraído com éter dietílico, e a fase orgânica (óleo) separada com um funil de separação (Figura 29 – a) e seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄).

O solvente foi removido por destilação em evaporador rotatório (Figura 29 - b) e o óleo conservado em congelador até a análise de cromatografia e os testes de toxicidade.



Figuras 28 – Extração de óleo essencial (Sistema Clevenger) (a) e detalhe da camada de óleo na coluna (b), no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG. (Foto: Fabíola Lino de Araújo).



Figuras 29 – Funil de separação (a) e destilação em Evaporador Rotatório (b), para remoção do solvente, realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG. (Foto Fabíola Lino de Araújo).

3.3.2 – Rendimento dos óleos essenciais

Após todas as etapas da destilação por arraste a vapor d'água dos óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, pesou-se e anotou-se a quantidade total de massa (g) obtida de cada espécie de eucaliptos nos dois períodos de extração.

Realizou-se o cálculo, levando em consideração a relação entre a massa total de folhas (g) utilizadas na extração (serapilheira, 30 e 60 dias após contato com a água das lagoas) e a massa (g) de óleo extraída, para se obter a porcentagem de óleo extraído em cada situação, possibilitando uma comparação de rendimento.

3.4 – Identificação dos componentes dos óleos essenciais

A identificação das substâncias constituintes dos óleos essenciais foi feita através da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes destes componentes. Existem várias formas de se realizar o processo cromatográfico, entre elas a cromatografia gasosa (COLLINS et al., 1997).

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada cromatografia gasosa. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre fase estacionária (sólido ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (COLLINS op. cit).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com uma boa resolução, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Um dos principais motivos que tornam a cromatografia gasosa de uso

freqüente é a sua sensibilidade. Dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10^{-12} g. Esta sensibilidade faz com que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas.

A técnica mais usada na cromatografia gasosa é a ebulição. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nessa corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que gera um sinal para o registrador (Figura 30).

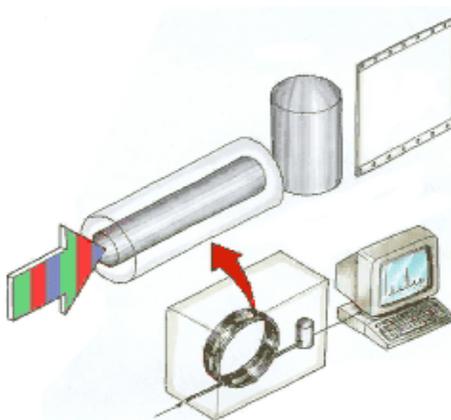


Figura 30 – Técnica de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.

Fonte: (www.cromatografiagasosa-tecnicasanaliticasLindeGases Ltda.htm). Acesso: 6 de junho de 2007.

As análises dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla* foram realizadas em cromatógrafo a gás Varian CP-3380, com coluna capilar Alltech – SE30 (30 m x 0,25 mm), e detector de ionização por chama, nas seguintes condições: 60 °C por 3 min, 5 °C/min até 250 °C, 250 °C por 15 min.

O gás de arraste foi hélio, com fluxo 1,5 mL/min. A análise por CG/EM foi realizada em cromatógrafo (gasoso) HP6890 acoplado a espectrômetro de massas HP5989A, com coluna capilar HP1 (25 m x 0,25 mm), utilizando as mesmas condições.

A identificação dos componentes do óleo foi baseada no índice de retenção de Kovats, calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos (IK), no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas e por comparação destes com dados da literatura.

3.5 – Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade aguda para avaliação de efeitos biológicos do óleo essencial extraídos de folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* foram realizados a partir do material disponibilizado pelo Laboratório de Fitoquímica (Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG) após extração por arraste a vapor (Sistema Clevenger).

A metodologia utilizada nos testes de toxicidade seguiu as normas estabelecidas pela ABNT (2004) para *Daphnia similis* e *D. laevis*, já descrita no Capítulo I.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Rendimento dos óleos essenciais

4.2 – Primeira etapa de extração

A Tabela 6 mostra a massa de folhas (g), a massa de óleo (g) e rendimento (%) dos óleos essenciais das duas espécies de eucaliptos em função do tempo inicial (serapilheira) e após 30 e 60 dias em contato com as lagoas estudadas.

Tabela 6 – Rendimento (%) dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla*.

Espécie	Inicial			30 dias			60 dias		
	Massa (g)	Óleo (g)	%	Massa (g)	Óleo (g)	%	Massa (g)	Óleo (g)	%
<i>E. grandis</i>	126,00	1,78	1,42	50,00	0,21	0,41	75,83	0,32	0,43
<i>E. urophylla</i>	126,60	1,06	0,84	48,37	0,15	0,30	71,62	0,16	0,22

Pode-se observar que *E. grandis* apresentou maior rendimento em todos os períodos avaliados (inicial, 30 e 60 dias) na primeira etapa de extração quando comparado a *E. urophylla*.

Tendo em vista que a produção de óleos essenciais depende não somente do estado metabólico e síntese dos tecidos, mas também está altamente integrada com a fisiologia de toda a planta (GIRARD, 2005), é possível que *E. grandis* se diferencie de *E. urophylla* apresentando uma maior produção de óleo essencial.

Outro aspecto observado foi que as folhas tanto de *E. grandis* quanto *E. urophylla* apresentaram uma diminuição na quantidade de óleo extraído em função do tempo avaliado, ou seja, as folhas da serapilheira (inicial) apresentaram maior rendimento de óleos essenciais que as folhas após 30 e 60 dias em contato com as lagoas (Figura 31).

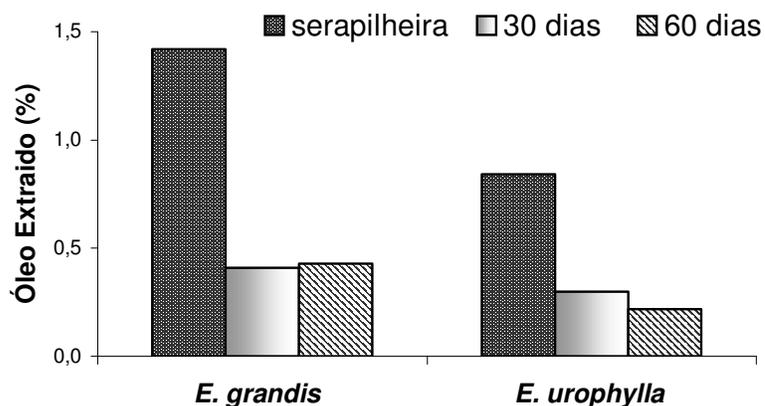


Figura 31 – Porcentagem (%) de óleos essenciais extraídos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente.

4.3 – Segunda etapa de extração

A Tabela 7 mostra a massa de folhas (g), a massa de óleo (g) e rendimento (%) dos óleos essenciais das duas espécies de eucaliptos em função do tempo inicial (serapilheira) e após 30 e 60 dias em contato com as lagoas estudadas, na segunda etapa de extração.

Tabela 7 – Rendimento (%) dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla*.

Espécie	Inicial			30 dias			60 dias		
	Massa (g)	Óleo (g)	%	Massa (g)	Óleo (g)	%	Massa (g)	Óleo (g)	%
<i>E. grandis</i>	204,10	1,74	0,85	65,10	0,39	0,61	65,80	0,45	0,68
<i>E. urophylla</i>	301,40	1,94	0,65	76,00	0,42	0,56	71,70	0,31	0,44

Novamente foi observado um maior rendimento de óleos essenciais das folhas de *E. grandis* assim como já havia sido constatado na primeira etapa de extração,

em todos os períodos (inicial, 30 e 60 dias). Porém essas porcentagens foram menores do que as observadas na primeira etapa de extração (Figura 32).

Uma possível explicação para a diminuição da porcentagem de óleo presente nas duas espécies de eucaliptos seja a influência de variáveis climáticas como temperatura atmosférica e precipitação que segundo Girard (2005) influenciam a quantidade e o conteúdo de óleo essencial em várias plantas aromáticas (GIRARD,op. cit). Estudo realizado por Thappa et al., (2004) observou em plantas de *Echinacea purpura* (L.), que tanto a temperatura como a umidade afetam o índice dos óleos essenciais.

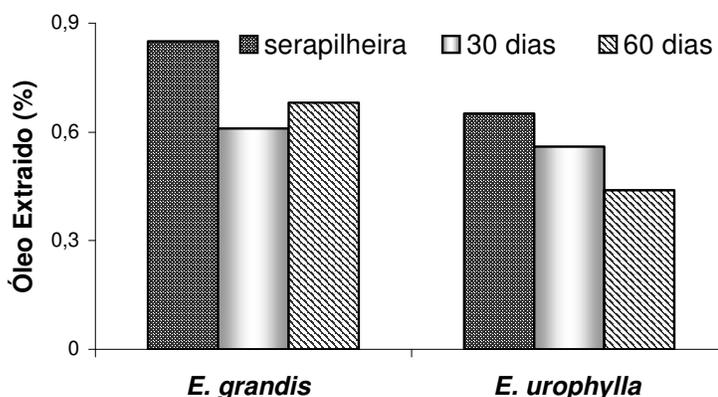


Figura 32 – Porcentagem (%) de óleos essenciais extraídos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente.

4.4 – Análise dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla*

Neste Capítulo, além da extração e avaliação do rendimento foram analisados os óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla* extraídos de folhas secas, e expostas nas lagoas por 30 e 60 dias. As Figuras 33 e 34 mostram os cromatogramas obtidos dos óleos analisados. De um modo geral, observa-se que os óleos são bastante complexos, sendo que o óleo de *E. urophylla* apresenta um maior número de constituintes.

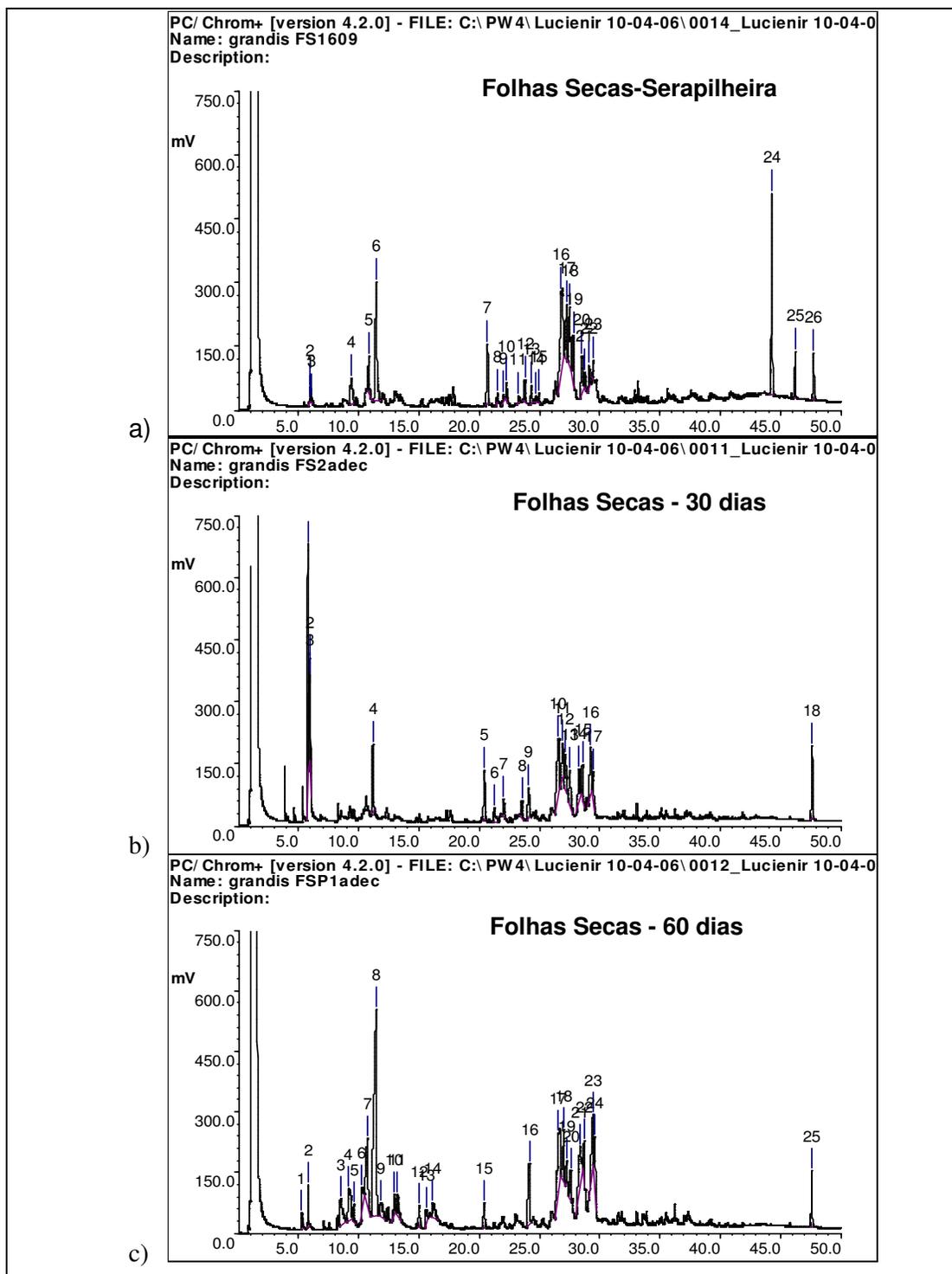


Figura 33 – Cromatogramas dos óleos essenciais de *E. grandis*: (a) Folhas Secas-Serapilheira; (b) Folhas Secas - 30dias e (c) Folhas Secas - 60dias.

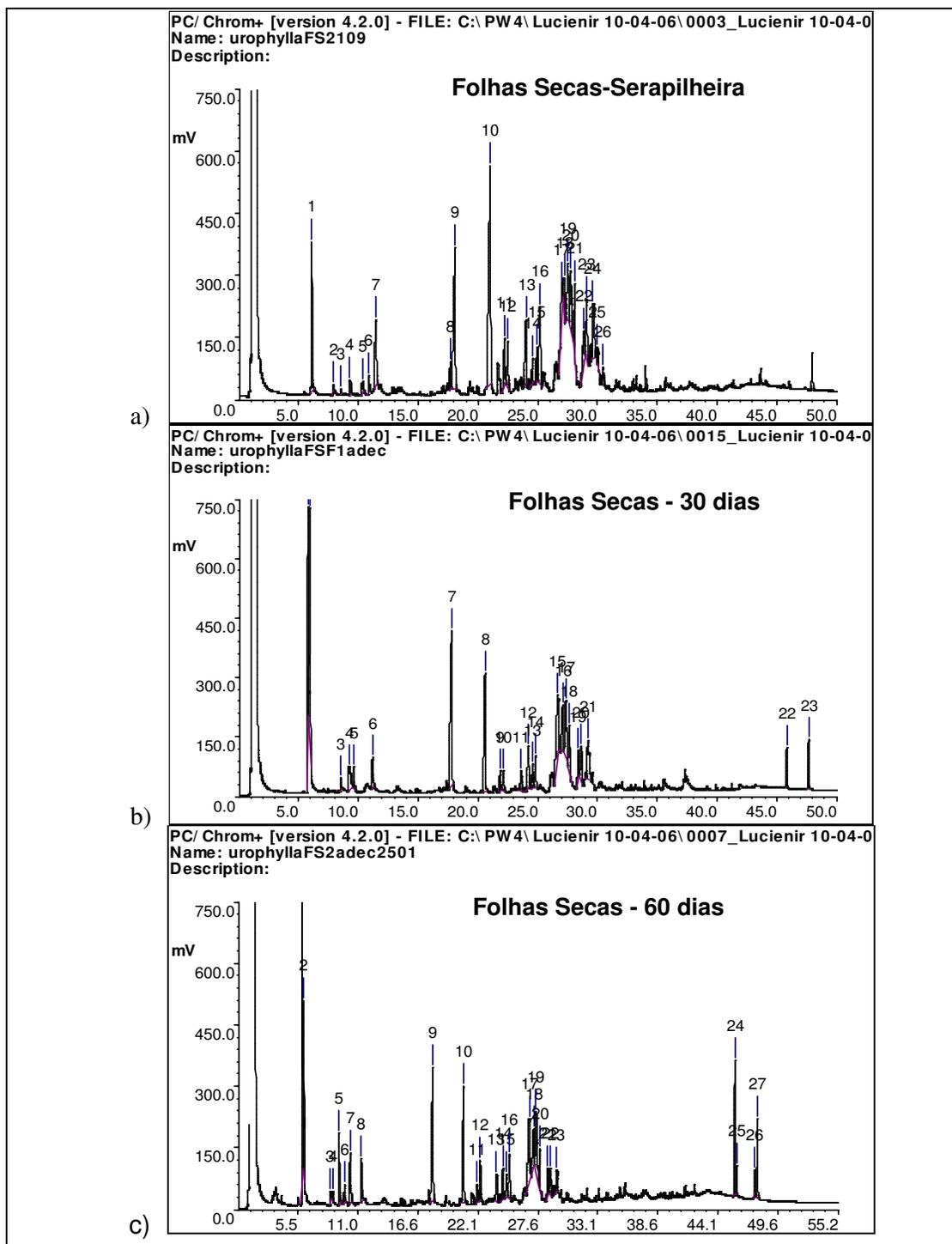


Figura 34 – Cromatogramas dos óleos essenciais de *E. urophylla*: (a) Folhas Secas-Serapilheira; (b) Folhas Secas- 30dias e (c) Folhas Secas- 60dias.

Quando se compara os cromatogramas das folhas secas com as folhas expostas à decomposição, observa-se que os perfis cromatográficos são bastante semelhantes, sendo que com 60 dias, o perfil apresenta uma menor complexidade, sugerindo que à medida que ocorre a exposição, os compostos vão sendo eliminados e não se mantêm presentes nas folhas, pois provavelmente foram extraídos pela água das lagoas.

No caso do *E. urophylla*, observa-se que os perfis cromatográficos dos óleos foram bastante parecidos. Observa-se ainda que à medida que as folhas vão sendo expostas à decomposição, aparecem alguns constituintes mais polares ou mais pesados ($Tr > 45$ min), sugerindo que estes sejam produtos de oxidação. Entretanto, devido à complexidade dos cromatogramas, não foi possível identificar todos os constituintes dos óleos essenciais.

A investigação dos óleos essenciais levou ao descobrimento de hidrocarbonetos isoméricos denominados terpenos, porém, os óleos essenciais são misturas muito complexas e muito variáveis em seus constituintes, sendo mais comuns somente os terpenos mais voláteis, dentre os quais destacam-se aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 carbonos e sesquiterpenos com 15 carbonos (DORAN e BROPHY, 1990; SIMÕES et al., 1999).

A identificação dos componentes do óleo de *E. grandis* e *E. urophylla* realizada pelo Laboratório Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG, baseou-se no índice de retenção de Kovats, calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (IK), no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas e por comparação destes com dados da literatura (ADAMS, 1995). Foi possível identificar como componentes principais do óleo das folhas de *E. grandis*, pineno, tujanol, cedreno. Nas folhas de *E. urophylla* encontrou-se pineno, cariofileno, humuleno, germancreno, óxido do cariofileno.

As substâncias identificadas nos óleos essenciais das folhas secas e após exposição nas lagoas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Substâncias identificadas nos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla*.

Espécie	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>
Substâncias	Alfa-pineno	Alfa-pineno
	Beta-pineno	3-iso-tujanol
	Para-Tolualdeído	3-neo-tujanol
	3-iso-tujanol	Acetato de verbanol
	3-neo-tujanol	Caríofileno
	1,7-di-epi-beta-cedreno	Humuleno
	alfa-tujopsanol	Germancreno A
		Cadna-1,4-dieno
		Óxido do cariofileno

4.5 – Testes de toxicidade

4.5.1 – *Eucalyptus grandis*

No caso do óleo essencial extraído das folhas da serapilheira da primeira etapa de extração, a CE50 foi de aproximadamente $5,35 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. similis* e de $4,10 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. laevis*. Neste caso, o óleo essencial de *E. grandis* apresentou um maior efeito tóxico em *D. laevis*. Na segunda etapa de extração, a CE50 para *D. similis* foi de $5,30 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e para *D. laevis* de $3,87 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, e novamente observou-se maior efeito de toxicidade aguda à *D. laevis*. Observou-se ainda que na segunda etapa de extração o efeito do óleo essencial foi ligeiramente maior do que o observado na primeira etapa para *D. laevis*. Já para *D. similis* praticamente não houve diferença (Figura 35).

O efeito tóxico observado nos óleos essenciais de *Eucalyptus* provavelmente está relacionado com compostos fungistáticos naturalmente produzidos por essa espécie, no seu metabolismo secundário (SALGADO, 2001).

Alguns trabalhos têm demonstrado a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes espécies de *Eucalyptus* frente a vários microrganismos (NASCIMENTO et al., 2000; FERESIN et al., 2002). Entretanto, por possuírem uma mistura complexa de compostos, os óleos essenciais não apresentam um mecanismo de ação antimicrobiana exatamente definido (JANSSEN, 1989). Neste contexto, Estanislau et al. (2001) verificaram que o óleo essencial das espécies *E. saligna*, *E. grandis* e *E. citriodora* apresentam atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*, fato não observado com o óleo essencial *E. microcorys* aos organismos testados.

Com o óleo essencial extraído das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha, os valores de CE50 da primeira e da segunda etapa de extração obtidos para *D. similis* foram de 5,49 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 5,18 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O efeito observado para *D. similis* com o óleo essencial de folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha foi semelhante ao observado com o óleo essencial das folhas da serapilheira.

Para *D. laevis* o valor de CE50 da primeira etapa de extração foi de 4,55 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, e na segunda extração foi de 4,86 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, sendo observado que tanto a primeira como a segunda extração apresentaram efeitos próximos.

Para o óleo essencial das folhas após 60 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha, verificou-se CE50 para *D. similis* de 4,71 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira etapa de extração, e CE50 de 5,03 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, na segunda etapa, neste caso o efeito observado na primeira etapa foi ligeiramente maior do que o observado na segunda etapa da extração

Com *D. laevis* ocorreu o mesmo que com *D. similis*, verificando-se menor valor de CE50 na primeira etapa de extração (4,49 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$), comparado à segunda etapa de extração (4,57 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$)

Observou-se que tanto nos testes realizados com o óleo essencial das folhas da serapilheira e após 30 e 60 dias o efeito tóxico foi um pouco maior na segunda etapa de extração provavelmente em função das condições climáticas.

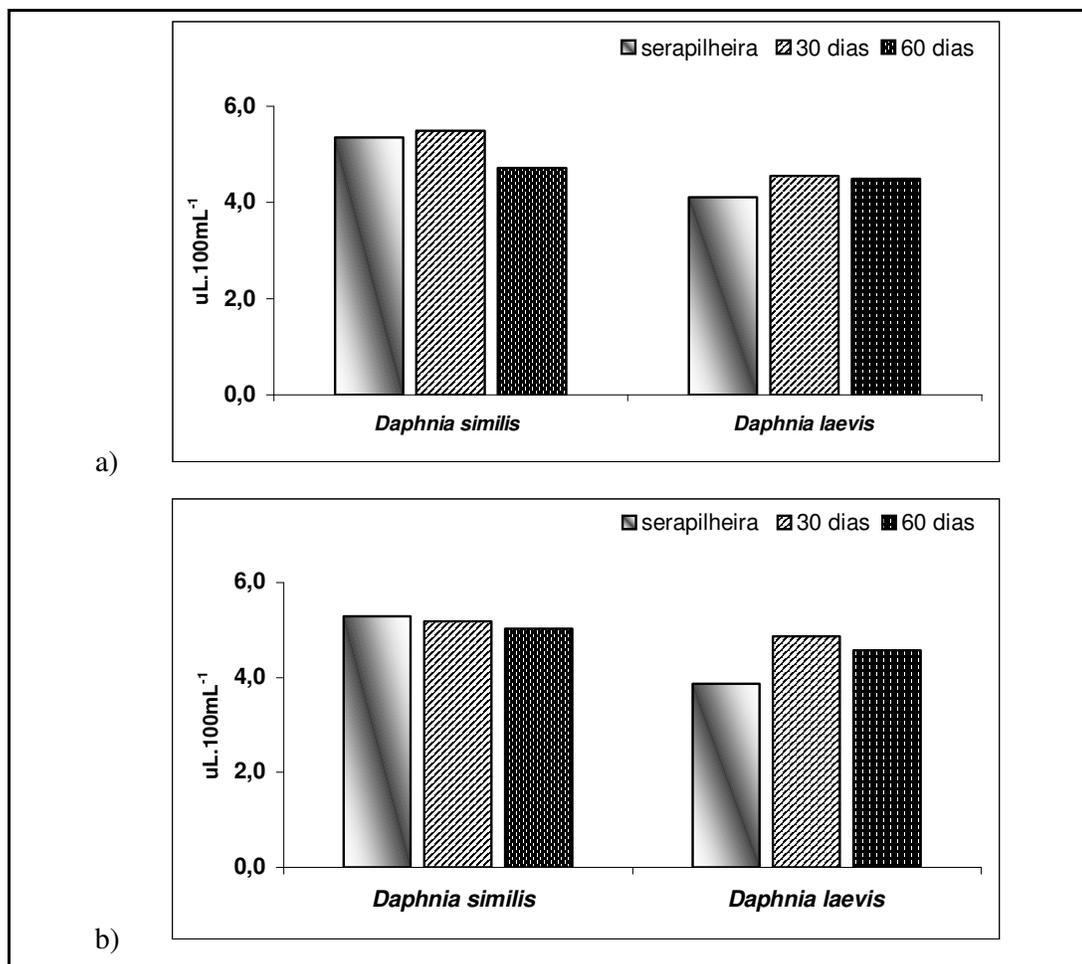


Figura 35 – Valores de CE50 ($\mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) para os testes realizados com óleo essencial das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Palmeirinha utilizando *D. similis* e *D. laevis*, na primeira (a) e segunda etapa (b) de extração.

4.5.2– *Eucalyptus urophylla*

No caso do óleo essencial das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, verificou-se para *D. similis* CE50 de 2,87 $\mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, na primeira etapa e de 2,97 $\mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa de extração, diferindo do que foi observado com as folhas de serapilheira de *E. grandis* para *D. similis*, apresentando um maior efeito de toxicidade na segunda etapa de extração.

Já para *D. laevis*, o valor de CE50 na primeira etapa de extração foi de 2,87 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e de 3,87 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa. Em testes preliminares realizados anteriormente no Laboratório de Ecotoxicologia da UFMG, a CE50 média do óleo essencial de *E. urophylla* foi de 2,45 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$.

Nos testes realizados com folhas em contato com a água da lagoa após 30 dias, houve uma diminuição do efeito de toxicidade aguda e conseqüentemente, os valores de CE50 foram mais elevados. Verificou-se para *D. similis* CE50 de 3,92 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira etapa e de 4,04 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa. Já para *D. laevis* a CE50 foi de 4,40 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 4,76 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para a primeira e a segunda etapa de extração, respectivamente (Figura 36).

As folhas que permaneceram durante o período de 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha apresentaram, para *D. similis*, CE50 de 3,44 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira etapa de extração e 4,12 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa. *D. laevis* apresentou CE50 de 3,48 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira etapa e 3,32 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa (Figura 36).

Observou-se que os óleos essenciais das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, 30 e 60 dias após contato com a lagoa Ferruginha, apresentaram efeito de toxicidade maior do que observados com os óleos de *E. grandis*, provavelmente em função dos componentes presentes nas folhas de *E. urophylla*.

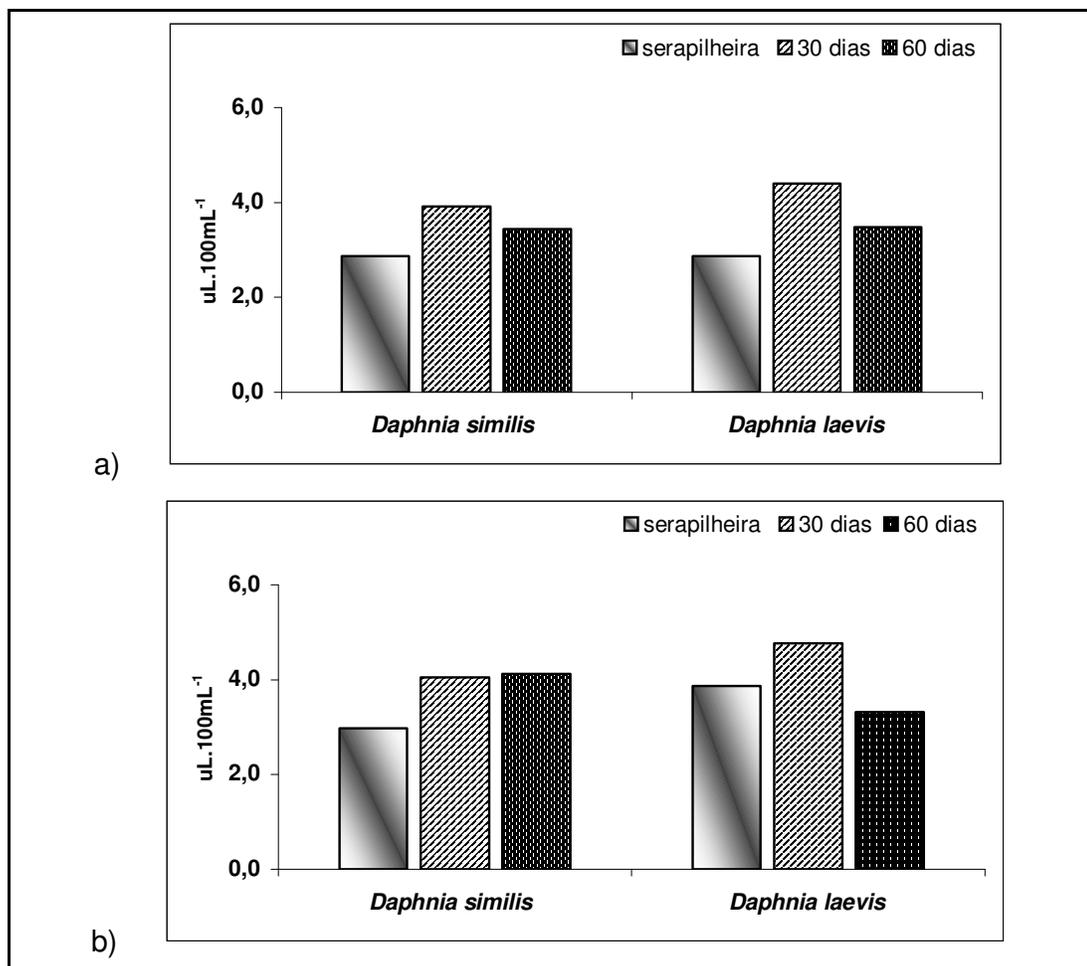


Figura 36 – Valores de CE50 ($\mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) para os testes realizados com óleo essencial das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Ferruginha utilizando *D. similis* e *D. laevis*, na primeira (a) e segunda etapa (b) de extração.

Salgado et al., (2001), avaliou a atividade fungitóxica do óleo essencial de folhas de três espécies de eucaliptos: *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. urophylla*, através de ensaios biológicos com os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*, utilizando diferentes concentrações de óleos.

Na maior concentração, os autores verificaram inibições significativas no crescimento micelial das espécies fúngicas, após período de 7 dias. No entanto, o óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* foi o que apresentou maior ação fungitóxica, fato atribuído à presença do composto denominado globulol, ausente em *E.camaldulensis* e *E. citriodora*.

5 - CONCLUSÕES

1. *E. grandis* comparado à *E. urophylla* apresentou maior rendimento de óleo essencial em todos os casos estudados, tanto na primeira quanto na segunda etapa de extração;
2. Na primeira etapa da extração (período chuvoso com temperaturas mais elevadas), a quantidade de óleo essencial extraída das folhas da serapilheira foi maior quando comparada com as folhas da serapilheira da segunda etapa de extração (período de seca com temperaturas menos elevadas), para as duas espécies estudadas, indicando influência das condições climáticas;
3. As folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* mantidas em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente, por 30 e 60 dias, apresentaram maior rendimento dos óleos essenciais na segunda etapa de extração;
4. A análise cromatográfica mostrou diferenças na composição do óleo essencial de *E. grandis* e *E. urophylla*, em função do período de coleta. No período de seca, verificou-se a presença de constituintes mais polares ou mais pesados sugerindo que estes sejam produtos de oxidação, e provavelmente constituintes polares tenham sido lixiviados pelas chuvas;
5. Nas folhas submetidas à decomposição durante 30 e 60 dias o mesmo comportamento foi observado. Houve uma concentração maior de compostos oxigenados com uma conseqüente diminuição dos compostos observados nas folhas serapilheira;
6. O óleo essencial de *E. urophylla* apresentou um número maior de constituintes comparado a *E. grandis*;
7. Os testes de toxicidade aguda com óleo essencial mostraram que *E. urophylla* apresentou maior efeito tóxico à *D. similis* e *D. laevis* comparado a *E. grandis*, provavelmente em função das substâncias presentes no mesmo. Além disso, verificou-se, tanto para *D. similis* quanto para *D. laevis*, maior efeito de toxicidade aguda do óleo essencial das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, provavelmente por possuir folhas mais espessas, indicando menor velocidade no processo de decomposição e liberação de compostos;

8. O óleo essencial de *Eucalyptus grandis* apresentou maior efeito de toxicidade aguda à *D. laevis* comparado a *D. similis*, tanto nos testes com folhas da serapilheira, quanto após 30 e 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha, nas duas etapas de extração.

CAPITULO III

“Extração, identificação e avaliação ecotoxicológica de extratos naturais de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*”.

1 – INTRODUÇÃO

Algumas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo o processo germinativo bem como o processo de divisão celular. Estes compostos são conhecidos como alelopáticos. O termo alelopatia refere-se à capacidade que as plantas têm de interferir no desenvolvimento de outras plantas por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou, quase sempre, no solo (MEDEIROS, 1990; FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

Os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários. Os recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, têm contribuído bastante para um maior conhecimento desses compostos secundários, os quais podem ser agrupados de diversas formas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000).

A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário vegetal e, na evolução das plantas, representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (WALLER, 1999).

Compostos com propriedades alelopáticas altamente diversificados quimicamente são freqüentemente encontrados nas plantas superiores; a composição e a quantidade desses compostos podem variar com a espécie estudada (PUTNAM, 1985). Especificamente para as espécies arbóreas, vários esforços foram envidados, nos últimos anos, visando identificar propriedades alelopáticas em espécies com potencial para compor sistemas agroflorestais e silvipastoris tanto no Brasil (BORGES et al., 1993; JACOBI e FERREIRA, 1991) como em outros países (CHOU, 1992; GONZÁLES et al., 1995; ZHANG, 1993).

Einhellig (1995), relatou vários mecanismos de ação desempenhados pelos agentes aleloquímicos nos vegetais, os quais atuam nos efeitos da atividade hormonal, na biossíntese e distribuição de metabólitos, na morfologia celular, na fotossíntese, ocasionando efeitos em plantas intactas, células isoladas, cloroplastos e clorofilas, na respiração, atuando nas mitocôndrias e em processos associados à membrana celular, causando acúmulo de íons e interferência nas relações hídricas.

Outros aspectos importantes da alelopatia, além dos fatores que afetam sua produção e liberação no ambiente, incluem sua absorção e translocação no organismo receptor, ou seja, sua efetividade como aleloquímico; uma vez esclarecidos, trarão importante contribuição para a compreensão deste fenômeno (FERREIRA e AQUILA op. cit).

Ensaio de germinação realizados com extrato etanólico do cravo-da-índia e eugenol puro (composto fenólico volátil) em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), beijo (*Impatiens balsamina* L.), crotalaria (*Crotalaria spectabilis* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.), verificaram que esses dois componentes possuem efeito alelopático, inibindo a germinação de sementes dessas plantas, assim como diminuindo o crescimento de algumas delas quando aspergida com o extrato (MAZZAFERA, 2003).

Neste contexto, fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos em que pelo menos um grupo hidroxil encontra-se ligado diretamente ao anel benzeno (THURMAN, 1982), são conhecidos por sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente de papel e celulose (CAMPANELLA, 1993). Os fenóis possuem comportamento de ácido fraco e dissolvem-se em meios polares, mas são pouco solúveis em hidrocarbonetos alifáticos.

Compostos fenólicos também estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores (CAMPANELLA, op. cit).

Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (ORTEGA, 1994).

Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Européia) (VINCENT, 1991), e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana). A diretiva (80/778 EEC) da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ para fenóis individuais. O Instituto Nacional Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional, estabeleceu como limite de exposição ao fenol, a concentração de 5 mg L⁻¹. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2005), estabeleceu em até 0,003 mg L⁻¹ C₆H₅OH, como concentração máxima de fenóis totais permitidos em águas de classe I e II (água doce). Já para águas de classe III, a concentração máxima de fenóis totais é de 0,01 mg L⁻¹ C₆H₅OH.

As substâncias fenólicas podem ser bactericidas ou bacteriostáticas, dependendo da concentração utilizada. Os esporos bacterianos e os vírus são mais resistentes do que as células vegetativas. Alguns compostos fenólicos são altamente fungicidas. Sua atividade antimicrobiana é reduzida em pH alcalino e na presença de material orgânico; baixas temperaturas e a presença de sabão também diminuem a atividade antimicrobiana (PELCZAR, 1980).

O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido freqüentemente incorporados à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas como os fenóis (NOLDIN et al., 2003).

1.1 – Polaridade da molécula

A polaridade de uma molécula está diretamente vinculada à polaridade das ligações entre seus átomos constituintes e também a sua geometria. A molécula polar é uma molécula com momento de dipolo diferente de zero enquanto uma molécula não-polar ou apolar tem momento dipolo elétrico igual a zero. Cada ligação de uma molécula poliatômica pode ser polar, mas a molécula como um todo pode ser não-polar ou apolar se os dipolos das ligações individuais se cancelarem (SOARES, 1989).

1.1.1 – Substâncias polares

Uma das propriedades mais importantes da água líquida é a sua capacidade de dissolver substâncias polares ou iônicas para formar soluções aquosas. As ligações iônicas ocorrem quando um ou mais elétrons são transferidos da camada de valência de um átomo para outro. O átomo que perdeu elétrons se torna positivo (cátions) e o que ganhou torna-se negativo (ânion) (SOARES, op.cit.).

A interação entre as moléculas do solvente (água) e as do soluto é que são responsáveis pelo processo de solubilização: quando uma substância iônica é dissolvida em água, os cátions são atraídos pelo lado "negativo" da molécula de água e os ânions pelos lados "positivos". Este processo é chamado de hidratação. A hidratação dos íons é que promove a "quebra" do retículo cristalino da substância iônica, ou seja, a dissolução: as forças existentes entre os cátions e ânions no sólido (ligação iônica) são substituídas por forças entre a água e os íons (SOARES, 1989).

1.1.2 – Substâncias não-polares ou apolares

Existem muitas substâncias, entretanto, que não são solúveis em água. Um exemplo é a gordura: a natureza não-polar de suas moléculas as torna incompatíveis com as moléculas polares de água. Uma regra geral para a solubilidade é que "o semelhante dissolve o semelhante", isto é, moléculas polares são miscíveis com moléculas polares, e apolares com moléculas apolares.

As propriedades da água, entretanto, são completamente diferentes em condições de alta temperatura e pressão. Acima de 300°C, em altas pressões, a água líquida é capaz de dissolver muitos compostos apolares. Mais diferente ainda é a água quando a pressão for igual ou maior de 218 atm e a temperatura maior do que 374°C (temperatura crítica): a água se torna um fluido supercrítico. Nestas condições, a água reúne propriedades de seu gás (tal como a densidade) e de seu líquido (capacidade de dissolução). Além de dissolver substâncias polares e iônicas, a água supercrítica é capaz de dissolver praticamente todos os compostos apolares. Uma das aplicações é na destruição de lixos tóxicos: a água supercrítica é misturada com os resíduos orgânicos e gás oxigênio; iniciado a chama, a combustão ocorre "*embaixo*" d'água! Isto só é possível graças às propriedades tipo-gás da água supercrítica e de sua capacidade de dissolver os resíduos (SOARES op. cit).

1.2 – Solubilidade das substâncias

A solubilidade de uma substância está diretamente relacionada com a natureza do solvente. Comparando-se dados de solubilidade com a constante dielétrica de cada um dos solventes, a ordem destas constantes é a seguinte: água > propileno glicol > álcool etílico > acetona > diclorometano > éter etílico > clorofórmio > tetracloreto de carbono >. Tanto a água quanto o hexano não dissolvem, por exemplo, a própolis; a água apresenta uma constante dielétrica muito alta, indicando que é um solvente muito polar e o hexano uma constante dielétrica muito baixa, e apolar. Como a própolis é composta por substâncias tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, os solventes com polaridades intermediárias conseguem interagir melhor com essas duas classes de substâncias (WIKIPEDIA, 2007).

Para separar as dezenas de substâncias apolares das polares, que apresentam atividades, precisa-se fazer a escolha correta dos solventes. Como exemplo, em um estudo realizado por (KOBASHI et al., 2000) foram feitas cinco extrações por maceração em diferentes solventes e utilizou-se a cromatografia em camada delgada para avaliar se houve a extração das substâncias polares contidas na própolis por esses solventes. Foram usados como fase móvel para a cromatografia,

uma mistura de solventes com diferentes polaridades. Inicialmente fez-se a cromatografia com o solvente mais apolar, o hexano, e em seguida foram misturados com um solvente polar, o acetato de etila. O aumento do solvente polar na fase móvel (acetato de etila nas proporções de 7:3; 1:1; 3:7; até 100%, proporcionou o arraste dos compostos polares nos extratos.

1.3 – Contaminação de sedimento

O sedimento pode ser considerado como resultado de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos, influenciando o metabolismo de todo o sistema (ESTEVES, 1988). Portanto, é um dos compartimentos mais importantes a serem estudados na avaliação do nível de contaminação dos ecossistemas aquáticos, dada a sua capacidade em acumular compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente por processo de decantação. Muito desses compostos podem estar presentes naturalmente em concentrações elevadas, mas, na maioria dos casos, esses valores são devidos à atividade antropogênica (POWER e CHAPMAN, 1992).

Uma vez no sedimento, esses contaminantes podem se associar a certas partículas (tornando-se não disponíveis para o ecossistema), sofrer transformações (originando formas mais ou menos tóxicas) ou migrar do sedimento para os organismos bentônicos ou para a coluna d'água. Níveis elevados de contaminantes persistentes no sedimento podem ou não acarretar efeitos para a biota aquática, dependendo de uma série de fatores que alteram a biodisponibilidade e a toxicidade (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006).

2 – OBJETIVOS

Este estudo visou inicialmente extrair, calcular o rendimento e identificar extratos hidroalcoólicos de diferentes polaridades e extratos aquosos das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as águas das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, no período de chuvas (outubro a dezembro/ 2005) e de seca (abril a julho/ 2006). A partir das extrações, foram verificados possíveis efeitos de toxicidade dos diferentes extratos sobre a biota aquática, através de testes de toxicidade com *Daphnia similis*, *D. laevis* e *Chironomus xanthus*.

Para tanto, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção de diferentes extratos pelo método Soxhlet;
- Comparação entre o rendimento dos extratos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*;
- Identificação dos compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla*, através de testes químicos e espectroscopia no infravermelho (IV);
- Avaliação da toxicidade das substâncias com maior polaridade, utilizando os organismos-teste *D. similis* e *D. laevis*;
- Avaliação da toxicidade das substâncias com menor polaridade no sedimento, utilizando o organismo-teste *Chironomus xanthus*.

3 – MATERIAIS E METODOS

3.1 – Períodos e frequências de amostragem

Para a execução desta etapa do projeto, também foram considerados dois períodos de coleta (descrito no Capítulo II), incluindo a coleta de folhas de eucaliptos da serapilheira e das mesmas depois de mantidas em contato com a água nas lagoas Palmeirinha e Ferruginha por um período de 30 e 60 dias, visando a extração e a identificação de constituintes químicos e a realização de testes de toxicidade aguda com o material extraído.

As folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* processadas para a obtenção dos extratos foram coletadas nas áreas de entorno das lagoas Palmeirinha e Ferruginha, respectivamente. Uma parte das folhas foi imediatamente processada e outra parte mantida em *litter-bags* de dois tamanhos diferentes. Após o período de 30 e 60 dias, foram levadas para o Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da UFMG para serem processadas, onde foram feitas as diferentes extrações após moagem, através de aparelho Soxhlet.

3.2 – Extração

As folhas foram lavadas primeiramente com água da torneira, depois com água destilada e secas a temperatura ambiente, para as diferentes extrações.

Para a preparação dos extratos, as amostras de folhas foram moídas e submetidas à extração exaustiva em aparelho Soxhlet utilizando os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. Após remoção do solvente por destilação à pressão reduzida foram obtidos os extratos hexânicos, clorofórmicos, acetato-etílicos e etanólicos. Os extratos aquosos foram obtidos por agitação por aproximadamente 3 horas à temperatura ambiente seguida de filtração e liofilização (MATOS,1997).

3.2.1 – Etapas da preparação dos extratos

As preparações dos extratos foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG conforme o fluxograma da Figura 37. Como material vegetal, foram utilizadas folhas secas (serapilheira), e secas após exposição em *litter-bags* nas lagoas por 30 e 60 dias em dois períodos diferentes de chuvas (outubro a dezembro/ 2005) e de seca (abril a julho/ 2006).

As folhas foram lavadas inicialmente com água de torneira e seguida com água destilada, secas em temperatura ambiente, moídas e submetidas à extração exaustiva em aparelho Soxhlet, utilizando solventes de polaridades diferentes (Figura 37).

O primeiro solvente utilizado foi o hexano, pois trata-se do solvente menos polar. A extração foi realizada na temperatura de ebulição do solvente hexano (~75°C). O processo de extração é completado quando o solvente em contato com as folhas torna-se transparente, o que dura aproximadamente 24 horas. Seguindo a ordem de polaridade, o próximo solvente usado foi o clorofórmio com uma temperatura de ~64°C, acetato de etila (~70°C) e por último o etanol. A extração foi realizada dessa maneira para que fosse possível extrair os compostos de acordo com suas polaridades e, assim, inferir sobre o efeito destes extratos nos testes de toxicidade, e também para se ter uma idéia dos tipos de compostos extraídos por cada solvente.

Após remoção dos solventes por destilação à pressão reduzida, foram obtidos os respectivos extratos. Os extratos aquosos foram obtidos por agitação magnética por aproximadamente 3 horas à temperatura ambiente seguida de filtração e liofilização. Não se realiza extração em aparelho Soxhlet com água devido à alta temperatura do solvente (100°C), a qual pode ocasionar decomposição dos componentes presentes nas folhas.

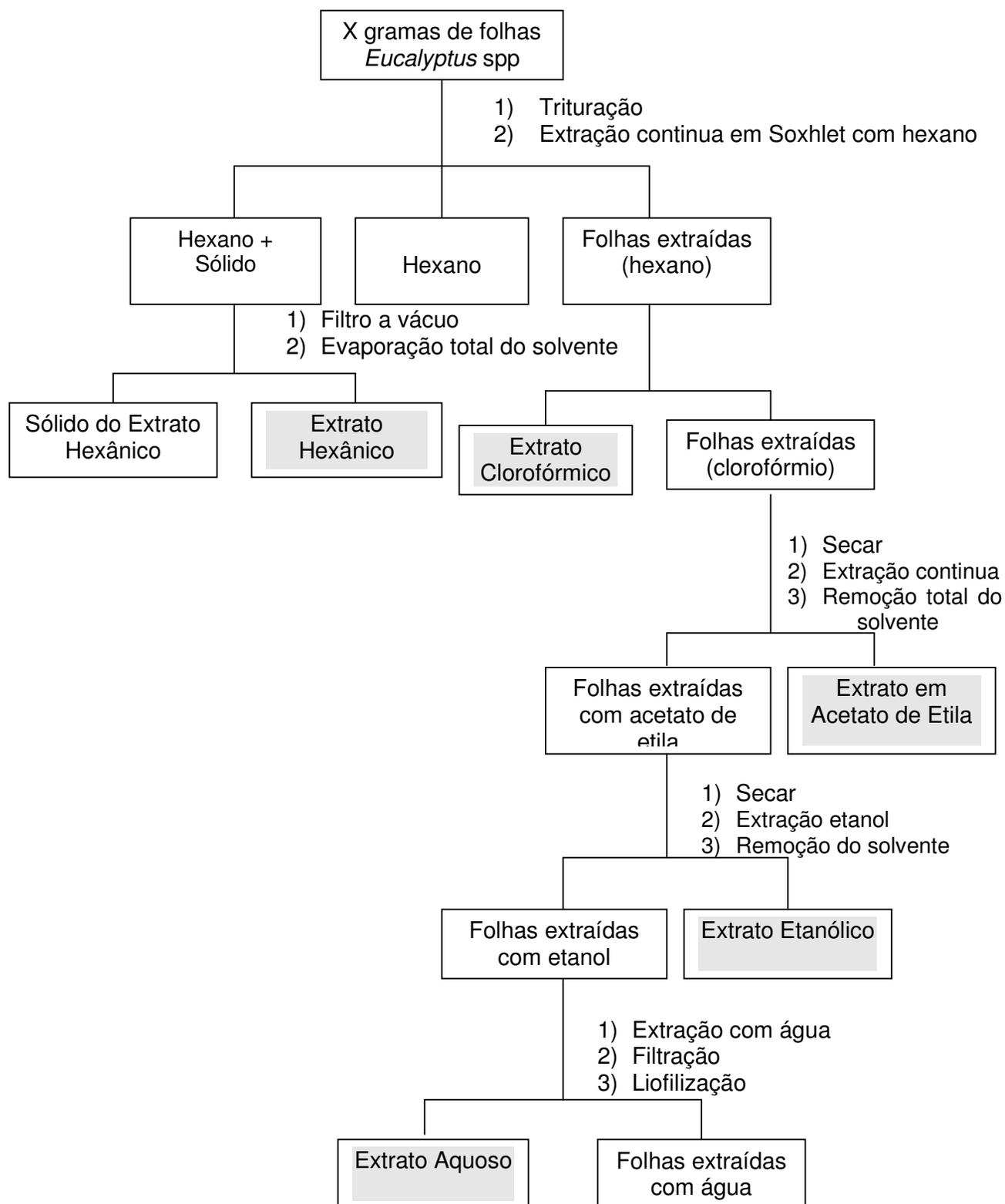


Figura 37 – Metodologia utilizada nas etapas de extração de extratos das folhas de *Eucalyptus* spp.



Figura 38 – Extração exaustiva - aparelho Soxhlet. (Foto: Fabíola Lino Araújo).

3.3 - Rendimento dos extratos hidroalcólicos e dos extratos aquosos

Após todas as etapas da extração exaustiva em aparelho Soxhlet com solventes de polaridades diferentes, foi realizada a pesagem em balança analítica dos extratos hidroalcólicos e dos extratos aquosos. Para tanto, foi anotada a massa total (g) de cada extrato das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira e após 30 e 60 dias em contato com as lagoas Palmeirinha e Ferruginha.

Foi então realizado o cálculo levando em consideração a massa total de folhas (g) utilizada na extração (serapilheira, 30 e 60 dias após contato com as lagoas) e a massa (g) de extrato hidroalcolico e aquoso, para se obter a porcentagem de extrato em cada situação e assim poder fazer uma comparação de rendimento das duas espécies de eucaliptos estudadas.

3.4 – Identificação dos compostos dos extratos hidroalcólicos e dos extratos aquosos

3.4.1 – Classes de substâncias identificadas nos extratos dos *E. grandis* e *E. urophylla*

Para a identificação das classes de substâncias presentes nos extratos foram realizados testes químicos específicos para algumas classes descritos no item 3.4.2 e espectroscopia no infravermelho descrita no item 3.4.3.

3.4.2 – Testes químicos

Realizaram-se testes químicos específicos para detecção de algumas classes de compostos nas folhas das duas espécies de eucaliptos, de acordo com Wagner et al. (1984).

Foram pesquisadas as seguintes classes de compostos: saponinas; flavonóides; taninos; fenóis, esteróides e triterpenos. Os procedimentos estão descritos a seguir:

- **SAPONINAS**

Alguns miligramas do extrato foram dissolvidos em 5-10 mL de água destilada e a solução foi filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução, fortemente por 2-3 minutos e observou-se a formação de espuma, sendo que espuma persistente e abundante (colarinho) indicou a presença de saponina (heterósides saponínicos).

- **ESTEROÍDES E TRITERPENOS**

Alguns miligramas do extrato foram dissolvidos em 3 mL de clorofórmio e filtrados quando necessário. Juntou-se ao extrato clorofórmico 2 mL de anidrido

acético. Agitou-se suavemente. A seguir, pelas paredes do tubo, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. No caso de reação positiva, observou-se uma sucessão de cores, de róseo ao azul e verde, sendo que a coloração verde indicou presença de esteróide, e a coloração azul ou rósea presença de triterpenos.

- **FLAVONÓIDES**

Alguns miligramas do extrato foram dissolvidos em 3 mL de metanol e filtrados quando necessário. Adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico concentrado e deixou-se esta solução reagir com 1 cm de fita de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indicou reação positiva.

- **FENÓIS E TANINOS**

Alguns miligramas do extrato foram dissolvidos em 4 mL de água destilada e filtrados quando necessário. Adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante escuro.

A coloração variável entre o azul e o vermelho indicou da presença de fenóis, o precipitado escuro de tonalidade azul indicou a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e a coloração verde, a presença de taninos condensados ou catéquicos.

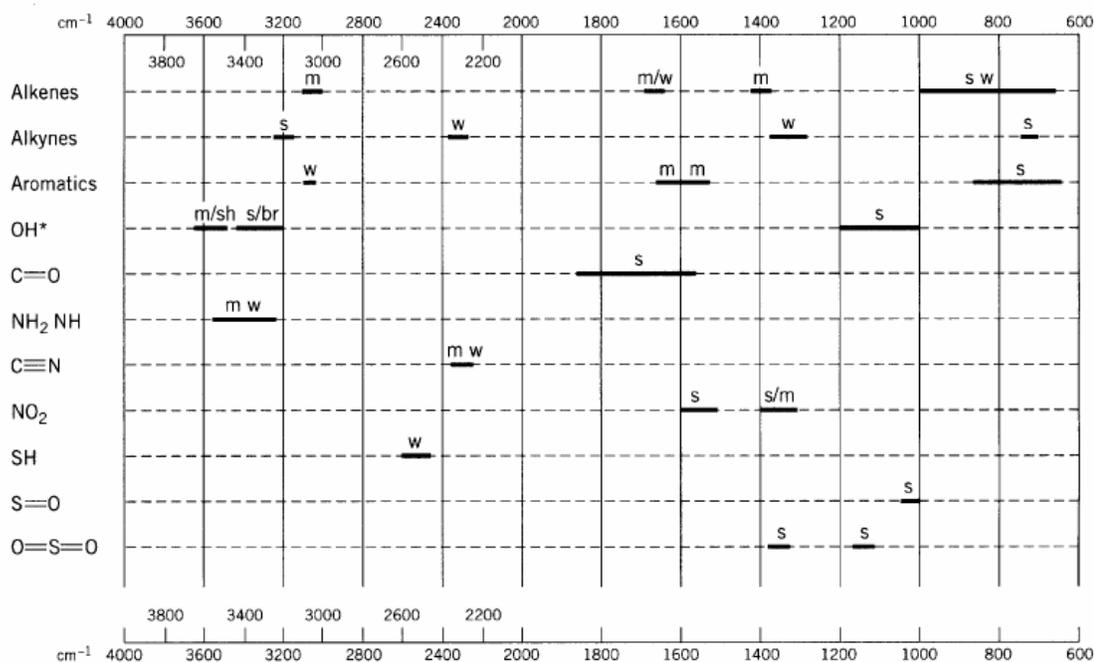
3.4.3 – Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica instrumental simples e rápida que pode evidenciar a presença de vários grupos funcionais. A espectroscopia no IV depende da interação de moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética (SILVERSTEIN et al., 2000).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na

mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite a obtenção, através do exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis para inferir sobre a estrutura dos compostos (SILVERSTEIN op cit.).

A Figura 39 lista os grupos mais comuns que fornecem suas frequências características.



*Free OH, medium and sharp; bonded OH, strong and broad

Figura 39 – Carta simplificada das frequências características dos grupos funcionais mais comuns. S=forte, w=fraca, m=média, sh=aguda, br=larga, alkenes=alquenos (insaturação), alkynes=alquinos, aromatics=aromáticos.

3.5 – Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade aguda para avaliação de efeitos biológicos dos extratos hidroalcolicos e aquosos extraídos das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* foram realizados a partir do material disponibilizado pelo Laboratório de Fitoquímica (Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG).

Após as extrações, os testes foram montados com o organismo-teste *Chironomus xanthus*, para os extratos com menor polaridade, ou seja, extrato hexânico, clorofórmico e acetato de etila, e para os extratos com maior polaridade, extrato etanólico e aquoso, foram utilizados os organismos-teste *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*.

A metodologia utilizada nos testes de toxicidade com *Daphnia similis* e *D. laevis* seguiu as normas estabelecidas pela ABNT (2004) e os testes com *Chironomus xanthus* seguiu as normas da USEPA (1994), ambos já descritos no Capítulo I.

3.5.1 – Preparo das soluções para os testes de toxicidade com os extratos mais polares utilizando *D.similis* e *D.laevis*

Para as soluções com os extratos mais polares foram preparadas soluções estoques, pesando-se 0,004 g dos extratos etanólico e aquoso, e diluído em eppendorf com água de cultivo (para que não houvesse interferência no testes de toxicidade), agitou e a partir dessa solução estoque foram preparadas as diluições dos testes para *D. similis* e *D. laevis*.

3.5.2 – Preparo dos sedimentos para os testes de toxicidade com os extratos menos polares utilizando *Chironomus xanthus*

Os extratos foram pesados e diluídos em solventes (cada extrato em um solvente específico). Após a diluição, as misturas (extratos+solventes) foram colocadas em contato com 5g de sedimento e utilizadas nos testes com *Chironomus xanthus*. As concentrações utilizadas encontram-se no item 4.4 e nas Tabelas dos AnexosVI, VII e IX.

Para eliminação completa do solvente utilizado para dissolver os extratos, estes foram expostos a um ventilador de ar quente evaporando assim o solvente que estava presente no sedimento permanecendo somente o extrato.

Para avaliar um possível efeito dos solventes utilizados, foram preparadas amostras contendo apenas o sedimento e o solvente empregado em cada caso, o solvente foi evaporado com o auxílio do ventilador (ar quente) e também testadas com *Chironomus xanthus*. Os solventes utilizados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Solventes utilizados para a dissolução de cada extrato.

Extrato	Solvente
Extrato Hexânico	Clorofórmio
Extrato Clorofórmico	Acetato de Etila
Extrato Acetato-etílico	Álcool Etílico
Extrato Etanólico	Água
Extrato Aquoso	Água

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Rendimento dos extratos

4.1.1 – Primeira etapa de extração de *Eucalyptus grandis*

Para a espécie *E. grandis*, foram utilizadas 32,37g de folhas (serapilheira) secas e trituradas, correspondendo inicialmente a 100% de massa de folhas utilizadas na extração. Na Tabela 10 encontram-se as quantidades e porcentagens de extratos obtidas para cada solvente.

Tabela 10 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcoólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de *E. grandis*.

	Massa (g)	%
Folha da serapilheira	32,37	100,0
Extrato hexânico	2,41	7,5
Extrato clorofórmico	1,77	5,5
Extrato acetato-etílico	0,44	1,4
Extrato etanólico	1,06	3,3
Extrato aquoso	-	-

- Não foi realizada extração.

A quantidade de extrato obtido variou em função dos solventes utilizados. O extrato que apresentou maior porcentagem de rendimento para as folhas de serapilheira de *E. grandis* foi o hexânico (menos polar) seguido pelo clorofórmio e etanólico.

Já para os extratos das folhas após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha foram utilizadas 14,15g para a preparação dos extratos (100% da massa), e novamente as folhas foram secas, trituradas e submetidas a extrações

sucessivas utilizando solventes de polaridades crescentes. Na Tabela 11, encontram-se a massa (g) e porcentagens de extratos obtidos para cada solvente.

Tabela 11 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcoólicos e extrato aquoso extraídos das folhas *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.

	Massa (g)	%
Folha após 30 dias	14,15	100,0
Extrato hexânico	1,25	8,8
Extrato clorofórmico	0,93	6,6
Extrato acetato-etílico	0,23	1,6
Extrato etanólico	0,49	3,5
Extrato aquoso	0,15	1,4

Verificou-se, assim como para as folhas de serapilheira, uma maior porcentagem de extrato hexânico, seguido pelo extrato em clorofórmio e etanólico. O extrato em acetato de etila e aquoso foram os extratos com menor rendimento.

Para a obtenção dos extratos das folhas após 60 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha, foram utilizadas 19,14g de folhas secas e trituradas. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcolóicos e extrato aquoso extraídas das folhas *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.

	Massa (g)	%
Folha após 60 dias	19,14	100,0
Extrato hexânico	2,31	12,1
Extrato clorofórmico	1,10	5,8
Extrato acetato-etílico	0,09	0,5
Extrato etanólico	0,62	3,2
Extrato aquoso	0,31	2,1

Como pode ser observado na Tabela 12, a quantidade de extrato hexânico ainda apresentou o maior rendimento comparado aos outros extratos, como ocorreu nas extrações anteriores (serapilheira e 30 dias), indicando que estes compostos são pouco solúveis em água e, portanto, não são extraídos pela mesma, permanecendo por um tempo maior nas folhas de eucaliptos.

Novamente, o extrato clorofórmico seguido pelo extrato etanólico apresentaram a segunda e a terceira maior porcentagem de extração, como observado com as folhas da serapilheira e 30 dias após contato com a lagoa.

A Figura 40 representa as Tabelas 10, 11 e 12 e mostra a quantidade de extratos obtidos em porcentagem de cada solvente utilizado (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanólico e água) nas três amostras utilizadas.

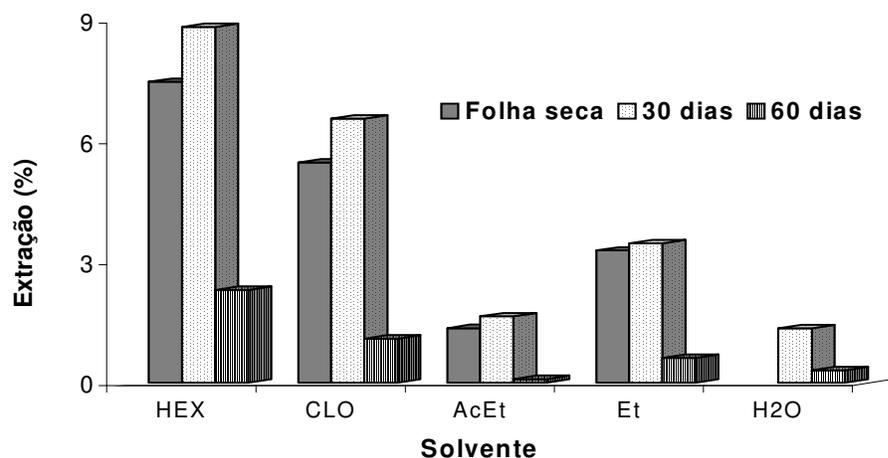


Figura 40 – Variação na quantidade de extratos hidroalcológicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *Eucalyptus grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Palmeirinha, entre outubro e dezembro de 2005.

Verificou-se que não houve uma grande variação na quantidade de massa (g) extraída das folhas da serapilheira e 30 dias após contato com a lagoa, diferindo, entretanto, dos valores obtidos após 60 dias, com acentuada queda nos valores obtidos, indicando que, de alguma forma, entre 30 e 60 dias, estes compostos foram extraídos ou arrastados pela água da lagoa.

Isto indica que os compostos mais polares atuam na composição química dos ambientes aquáticos no início da decomposição da matéria orgânica, pois são facilmente liberados quando em contato com água das lagoas, e em pequenas concentrações podem servir de fonte de energia para os organismos presentes neste ambiente, mas que em concentrações elevadas possuem efeito tóxico.

A maior quantidade de compostos pouco polares (presentes no extrato hexânico) no período chuvoso, pode indicar que a planta apresenta mecanismo de proteção para impedir que compostos solúveis sejam arrastados pelas águas das chuvas.

4.1.2 – Segunda etapa de extração de *Eucalyptus grandis*

Para a segunda etapa de extração *E. grandis* (período de seca e temperaturas menos elevadas), as massas obtidas (g) e a porcentagem (%) dos extratos das folhas de serapilheira, a partir da massa de folhas utilizada inicialmente (24,42 g), estão expressas na Tabela 13.

Tabela 13 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcoólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de *E. grandis*.

	Massa (g)	%
Folhas da serapilheira	24,42	100,0
Extrato hexânico	1,36	5,6
Extrato clorofórmico	0,99	4,0
Extrato acetato-etílico	1,22	5,0
Extrato etanólico	4,86	19,9
Extrato aquoso	0,89	3,7

Nesse caso, obteve-se maior porcentagem de extrato etanólico, seguido dos extratos hexânico, em acetato de etila, clorofórmico e aquoso, diferindo do que ocorreu na primeira extração, em que houve maior porcentagem de extrato hexânico (Tabela 10), indicando que no período seco há uma maior produção de compostos mais polares do que no período chuvoso.

Na Tabela 14, encontram-se os dados da extração das folhas após 30 dias de exposição na lagoa Palmeirinha. A quantidade de folhas utilizada no processo foi de 30,52g e as porcentagens de cada extrato obtido estão expressas nesta mesma tabela.

Tabela 14 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E. grandis*, após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.

	Massa (g)	%
Folha após 30 dias	30,52	100,0
Extrato hexânico	3,67	12,0
Extrato clorofórmico	1,82	6,0
Extrato acetato-etílico	0,54	1,8
Extrato etanólico	1,14	3,7
Extrato aquoso	0,17	0,6

Verificou-se após 30 dias de contato das folhas com a água da lagoa, maior porcentagem de extrato hexânico, o que não ocorreu com as folhas da serapilheira, seguida das porcentagens dos extratos em clorofórmio, etanólico, acetato de etila e aquoso, indicando, novamente, que após este período praticamente todos os compostos solúveis (presentes nos extratos etanólico e aquoso) foram extraídos pelas águas da lagoa.

Isso demonstra que no ambiente aquático esses compostos são liberados nas etapas iniciais de decomposição podem causar efeitos tóxicos ao ambiente quando em concentrações elevadas.

Comparando-se os dados de extração após 30 dias dos dois períodos (seco e chuvoso) para *E. grandis* (Tabela 11 e 14), pode-se verificar que o comportamento foi praticamente o mesmo e que o extrato hexânico foi o que apresentou maior massa, também na primeira extração.

A Tabela 15 mostra os dados dos extratos obtidos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha. A massa de folhas utilizada foi de 31,20g, verificando-se nessa extração pequenas mudanças nas porcentagens dos extratos obtidos.

Tabela 15 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcoólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha.

	Massa (g)	%
Folhas após 60 dias	31,20	100,0
Extrato hexânico	1,76	5,6
Extrato clorofórmico	2,09	6,7
Extrato acetato-etílico	0,33	1,1
Extrato etanólico	0,71	2,3
Extrato aquoso	0,18	0,6

Nesta extração, o extrato clorofórmico apresentou maior rendimento, seguido pelo extrato hexânico, extratos etanólico, acetato de etila e por último o aquoso, com menor rendimento, como já verificado nas outras extrações, em função da sua polaridade, ou seja, acaba sendo mais facilmente liberado para o ambiente aquático já desde o início de sua exposição à água.

Pode-se observar que de 30 para 60 dias, não ocorreram grandes variações, significando que após 30 dias praticamente todos os compostos foram extraídos pelas águas das lagoas. A Figura 41 mostra a variação no rendimento dos extratos em função da permanência na lagoa.

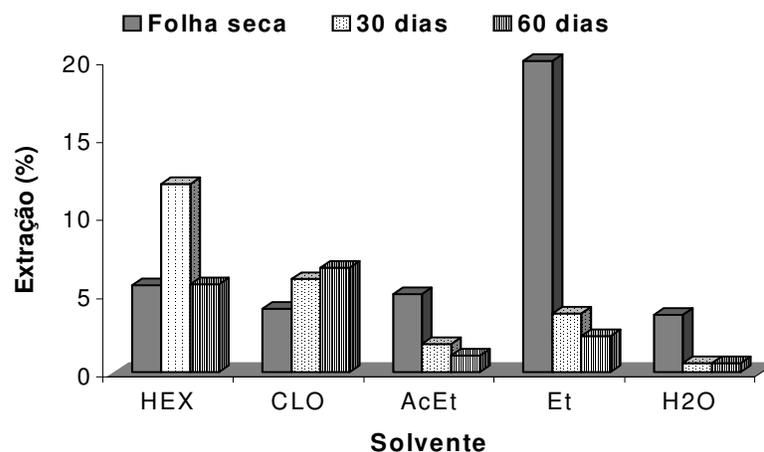


Figura 41 – Variação na quantidade de extratos hidroalcólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *Eucalyptus grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Palmeirinha entre maio e julho de 2006.

Observa-se pelo gráfico, que o extrato hexânico teve maior rendimento nas folhas após 30 dias em contato com a lagoa. Já nas folhas da serapilheira e após 60 dias, o rendimento foi igual. No caso do extrato clorofórmico, o maior rendimento foi verificado nas folhas após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha, apesar da pequena variação quando comparado com as duas outras fases, provavelmente em função das condições climáticas.

O extrato em acetato de etila apresentou um maior rendimento nas folhas secas e um rendimento menor nos outros casos. Já para o extrato etanólico, a variação do rendimento foi grande, com porcentagem bem maior nas folhas da serapilheira do que nas folhas após 30 e 60 dias, fato também observado no caso do extrato aquoso.

4.1.3 – Primeira etapa de extração de *Eucalyptus urophylla*

Para a obtenção dos extratos de *E. urophylla* foram utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente (Figura 37 – Fluxograma).

No caso de *E. urophylla*, a massa de folhas de serapilheira utilizada foi de 33,20g, e as porcentagens dos extratos obtidos estão na Tabela 16.

Tabela 16 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de *E. urophylla*.

	Massa (g)	%
Folha da Serapilheira	33,20	100,0
Extrato hexânico	1,34	4,1
Extrato clorofórmico	0,09	0,3
Extrato acetato-etílico	0,43	1,3
Extrato etanólico	6,60	19,9
Extrato aquoso	-	-

Pode-se observar que *E. urophylla* apresentou um comportamento bem diferente de *E. grandis* (Tabela 10). No caso de *E. urophylla*, o extrato com maior massa foi o etanólico, seguido do hexânico, clorofórmico e acetato-etílico. Observou-se, também, uma menor porcentagem de extrato em clorofórmio para *E. urophylla* comparado a *E. grandis* e praticamente a mesma porcentagem de extrato em acetato de etila.

Na Tabela 17, são apresentados os dados das extrações após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha, incluindo as massas (g) e as porcentagens de extração.

Tabela 17 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha.

	Massa (g)	%
Folha após 30 dias	14,82	100,0
Extrato hexânico	0,81	5,5
Extrato clorofórmico	0,90	6,1
Extrato acetato-etílico	0,27	1,8
Extrato etanólico	0,54	3,6
Extrato aquoso	0,09	0,8

Para as folhas após 30 dias de exposição na lagoa Ferruginha, houve uma diminuição da massa do extrato etanólico, sugerindo que os compostos presentes neste extrato são bastante hidrossolúveis e foram extraídos pela água da lagoa; houve também um aumento na concentração de extrato clorofórmico, que é um extrato apolar e, provavelmente, sua liberação no ambiente aquático ocorra em etapas mais avançadas de decomposição.

Após 60 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha, foram realizadas novamente as extrações e os dados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E.urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha.

	Massa (g)	%
Folha após 60 dias	19,27	100,0
Extrato hexânico	1,07	5,6
Extrato clorofórmico	1,01	5,2
Extrato acetato-etílico	0,15	0,8
Extrato etanólico*	-	-
Extrato aquoso	0,17	1,1

Observa-se que todos os extratos, exceto o extrato etanólico não obtido, tiveram rendimento próximo ao que ocorreu com as folhas após 30 dias. Isso provavelmente ocorre em função da liberação de grande parte das substâncias polares nesse estágio de decomposição, permanecendo uma porcentagem de substâncias apolares.

A Figura 42 mostra a variação que ocorreu em função do tempo e do solvente utilizado na preparação dos extratos. No caso dos extratos hexânicos, as folhas após 30 e 60 dias apresentaram uma porcentagem ligeiramente maior desse extrato do que as folhas da serapilheira. No caso do extrato em clorofórmio, isso também foi observado, embora as folhas da serapilheira tenham apresentado uma porcentagem muito menor deste tipo de extrato quando comparadas às folhas após 30 e 60 dias em contato com a lagoa. Já para o extrato em acetato de etila, não houve grande variação das porcentagens das folhas da serapilheira e após 30 e 60 dias.

O extrato etanólico apresentou maior porcentagem de rendimento nas folhas da serapilheira como pode ser observado no gráfico abaixo, indicando que os constituintes mais polares são os mais presentes nas folhas de *E. urophylla* e que, por serem mais polares, são os extraídos pela água da lagoa, diferindo de *E.*

grandis, onde os constituintes menos polares foram os mais abundantes. Para o extrato aquoso, houve pequena variação das porcentagens de rendimento.

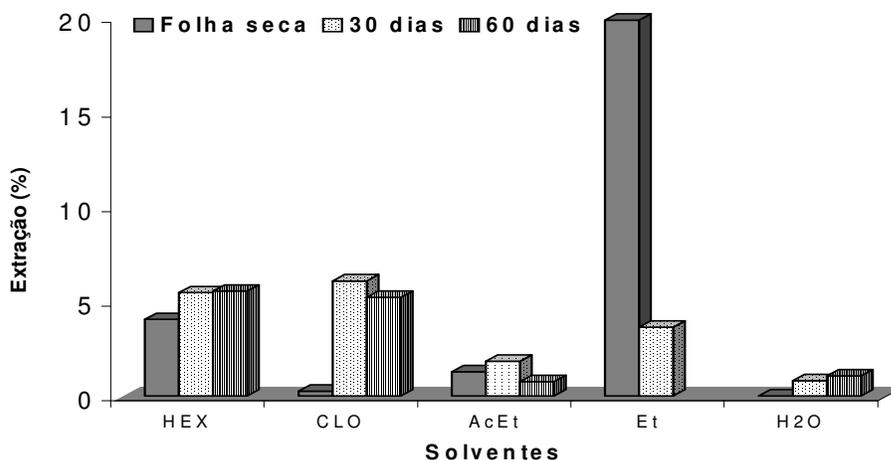


Figura 42 – Variação na quantidade de extratos das folhas de *Eucalyptus urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Ferruginha, entre outubro e dezembro de 2005.

4.1.4 – Segunda etapa de extração de *Eucalyptus urophylla*

A Tabela 19 mostra os resultados das extrações das folhas da serapilheira coletadas na área de entorno da lagoa no período de seca.

Tabela 19 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcoólicos e extrato aquoso extraídos das folhas de serapilheira de *E. urophylla*.

	Massa (g)	%
Folhas da serapilheira	30,08	100,0
Extrato hexânico	1,65	5,5
Extrato clorofórmico	1,40	4,6
Extrato acetato-etílico	0,70	2,3
Extrato etanólico	4,13	13,7
Extrato aquoso	1,05	3,5

Nesse caso, o extrato com maior rendimento foi o etanólico, fato já verificado na extração realizada na primeira etapa do trabalho. O extrato hexânico foi o segundo em rendimento, seguido do extrato clorofórmico, extrato aquoso e por último do acetato de etila.

Já para as folhas após 30 dias, o rendimento dos extratos foi diferente do que se observou para as folhas da serapilheira, como mostra a Tabela 20.

Tabela 20 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha.

	Massa (g)	%
Folhas da serapilheira	31,43	100
Extrato hexânico	0,27	0,8*
Extrato clorofórmico	1,83	5,8
Extrato acetato-etílico	0,49	1,6
Extrato etanólico	0,97	3,1
Extrato aquoso	0,19	0,6

* perda de material

Com as folhas após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha, desconsiderando o extrato hexânico, em que houve perda de material, o extrato com maior rendimento foi o clorofórmico, semelhante ao que ocorreu na primeira extração. O segundo extrato com maior rendimento foi o etanólico, com 3,1% do valor total, seguido do acetato de etila e aquoso. Mais uma vez, verificou-se que a água da lagoa foi capaz de extrair os compostos mais polares das folhas.

Quanto às folhas após 60 dias em contato com a lagoa, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 – Massa (g) e porcentagem (%) dos extratos hidroalcóolicos e extrato aquoso extraídos das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha.

	Massa (g)	%
Folhas da serapilheira	30,31	100,0
Extrato hexânico	1,46	4,8
Extrato clorofórmico	1,57	5,2
Extrato acetato-etílico	0,28	0,9
Extrato etanólico	0,72	2,4
Extrato aquoso	0,21	0,7

Nesse caso, a extração em clorofórmio foi a de maior rendimento, seguido dos extratos hexânico, etanólico, acetato de etila e o extrato aquoso. Verificou-se que o comportamento, neste caso, foi similar ao obtido na primeira extração, não havendo alterações em função dos períodos.

A Figura 43 mostra a variação do rendimento dos extratos em função da amostra e permanência na lagoa.

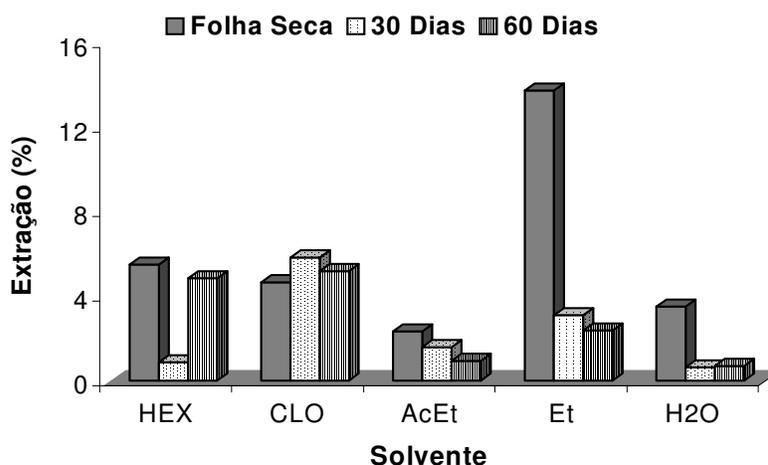


Figura 43 – Variação na quantidade de extratos das folhas de *Eucalyptus urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com as águas da lagoa Ferruginha, entre maio e julho de 2006.

A Figura 45 mostra os rendimentos dos extratos, nas diferentes condições de extração. Para o extrato hexânico, os rendimentos foram praticamente os mesmos, embora não tenha sido considerado o rendimento das folhas após 60 dias, pois houve perda de material. No caso do extrato em clorofórmio, a variação do rendimento foi bem pequena como pode-se observar pela Figura 43. Na extração em acetato de etila, as folhas da serapilheira apresentaram maior rendimento seguido pelas folhas após 30 e 60 dias, verificando-se uma diminuição ao longo do período de exposição na lagoa. Para o extrato etanólico, houve grande variação no rendimento, sendo observado um maior rendimento nas folhas da serapilheira. O mesmo ocorreu com o extrato aquoso, evidenciando que os compostos mais polares foram extraídos pela água, na lagoa Ferruginha.

4.2 – Testes Químicos

As Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados obtidos para os testes químicos realizados para as duas espécies de eucaliptos estudadas. Os extratos submetidos aos testes químicos foram àqueles obtidos na primeira etapa de extração (período chuvoso).

Tabela 22 – Classes metabólicas identificadas nos extratos das folhas de *Eucalyptus urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após contato com a lagoa Ferruginha.

AMOSTRAS	ESTERÓIDES				
	SAPONINAS	/TRITERPENOS	FLAVONOIDES	TANINOS	FENÓIS
Hexano – Folhas serapilheira		+		+	
Clorofórmio - Folhas serapilheira		+	+		
Acetato de etila – Folhas serapilheira		+		+	
Etanólico - Folhas serapilheira			+		+
Hexano -FS* 1ª decomposição			+		+
Clorofórmio - FS* 1ª decomposição			+	+	
Acetato de etila – FS* 1ª decomposição			+		+
Etanólico – FS* 1ª decomposição			+	+	
Aquoso - FS* 1ª decomposição			+		+
Hexano - FS* 2ª decomposição		+	+		
Clorofórmio - FS* 2ª decomposição		+	+		+
Acetato de etila – FS* 2ª decomposição		+	+		+
Aquoso - FS* 2ª decomposição	+				

*Folhas Secas

Tabela 23 – Classes metabólicas identificadas nos extratos das folhas de *Eucalyptus grandis* da serapilheira, 30 e 60 dias de após contato com a lagoa Palmeirinha.

AMOSTRAS	ESTERÓIDES				
	SAPONINAS	/TRITERPENOS	FLAVONOIDES	TANINOS	FENOIS
Hexânico – Folhas serapilheira		+	+		+
Clorofórmio – Folhas serapilheira		+	+		+
Acetato de etila – Folhas serapilheira	+	+	+	+	
Etanólico – Folhas serapilheira	+			+	
Hexânico – FS* 1ª decomposição	+	+	+		+
Clorofórmio – FS* 1ª decomposição	+	+	+		+
Acetato de etila – FS* 1ª decomposição	+		+	+	
Etanólico – FS* 1ª decomposição	+		+	+	+
Aquoso – FS* 1ª decomposição				+	
Hexânico – FS* 2ª decomposição		+	+		+
Clorofórmio – FS* 2ª decomposição	+	+	+		+
Acetato de etila – FS* 2ª decomposição	+	+	+	+	
Etanólico – FS* 2ª decomposição	+		+	+	+
Aquoso – FS* 2ª decomposição					

* Folhas secas.

Extratos vegetais são misturas bastante complexas e que podem apresentar várias classes de compostos (FARMER, 1967). Dentre as classes de compostos orgânicos podemos citar saponinas; flavonóides; taninos; fenóis, esteróides e triterpenos entre outras. Os compostos são extraídos de acordo com a utilização de solventes específicos.

Todas as classes de compostos analisadas foram detectadas nos extratos das espécies estudadas.

Para *E. urophylla*, verificou-se presença de saponina apenas no extrato aquoso das folhas após 60 dias de exposição à água. Já os esteróides e triterpenos foram amplamente detectados em quase todos os extratos analisados. Flavonóides, taninos e fenóis, que são compostos mais polares, foram detectados principalmente nos extratos mais polares.

No caso de *E. grandis*, verificou-se presença de saponinas, esteróides e triterpenos em praticamente todos os extratos analisados. Os taninos também foram compostos freqüentes nos extratos.

Segundo Browling (1963), Lewin e Golidsein, (1991), os materiais solúveis em solventes orgânicos incluem os ácidos graxos e resinosos e seus ésteres, substâncias não saponificáveis, pigmentos, esteróides e triterpenos etc. Já a fração solúvel em água inclui os sais inorgânicos, açúcares, frações de polissacarídeos, do amido e substâncias pécticas, mucilagens, taninos hidrolizáveis e alguns pigmentos.

Taninos são polifenóis de peso molecular variado, solúveis em água e têm a propriedade de precipitar proteínas. Os polifenóis simples (flavonóides) de baixo peso molecular não possuem estas propriedades (FARMER, 1967). Em termos químicos, os taninos são classificados em taninos hidrossolúveis, que são uma mistura de ácido gálico, pirogálico e ésteres de açúcares, glicose com ácidos gálico e digálico (CONNER; RONE, 1975).

De acordo com Zucker (1993), os taninos hidrolizáveis seriam os responsáveis pela defesa das plantas contra os herbívoros e os taninos condensáveis podem assegurar a defesa contra microorganismos patogênicos. Os taninos ocorrem amplamente nos vegetais, porém, sua extração comercial é feita através da casca e/ou do cerne da madeira, locais onde são encontrados em maiores teores e também onde costumeiramente ocorrem os maiores problemas com injúrias e

ataques de agentes xilófagos da madeira. De acordo com Farmer (1967), os taninos possuem propriedade germicida muito forte e são responsáveis pela durabilidade natural de algumas madeiras. Segundo Aquegil et al., apud Granja (1986), os taninos têm função fungicida e bactericida em qualquer solução que possua seus componentes, desempenhando papel moderador nas oxidações das substâncias antiorgânicas e antifermentativas.

Sabe-se que o tanino é uma substância amplamente distribuída entre as plantas. Em algumas espécies alcançam uma concentração superior a 40% na casca, sendo aí o local de maior concentração deste produto, o que permite a sua exploração comercial (PASTORE JUNIOR, 1977). Algumas espécies do gênero *Eucalyptus* também podem conter quantidade razoável deste produto em sua casca.

4.3 – Espectros no Infravermelho

Foram obtidos espectros no infravermelho de todos os extratos preparados para as duas espécies nas duas etapas de extração. Entretanto, como os espectros mostraram-se bastante semelhantes serão apresentados apenas os obtidos para folhas após 30 dias de exposição nas lagoas para as duas espécies, durante a primeira etapa de extração entre outubro e dezembro de 2005.

As Figuras de 1 a 5 (Anexo XIV) mostram os espectros obtidos para os extratos de *E. grandis* e as Figuras de 6 a 10 (Anexo XIV) mostram os espectros obtidos para os extratos de *E. urophylla*.

A Tabela 24 mostra as principais bandas obtidas para os espectros dos extratos.

Tabela 24 – Algumas absorções observadas nos espectros dos extratos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*.

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Grupo funcional	Possíveis classes de compostos
3000-3600	OH	Álcool, fenol
1550-1700	C=C	Compostos insaturados podendo ser aromático, ésteres graxos,
1380-1500	CCH	Carboidrato, esteróide
1250	CO de ésteres	Carboidrato, álcoois, flavonóides
1000-1100	C-O de álcool	Álcool, fenol, flavonóides

Para as duas espécies de *Eucalyptus* estudadas, verificou-se que os espectros no infravermelho dos extratos, obtidos com o mesmo solvente, mostraram-se muito parecidos.

Os espectros dos extratos hexânicos e clorofórmicos mostraram bandas de absorção comuns a várias classes de compostos alifáticos, tais como ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, esteróides, entre outros. Já os espectros dos extratos em acetato de etila e etanol mostraram bandas de absorção características de ácidos graxos e compostos aromáticos fenólicos. Os extratos aquosos mostraram-se constituídos principalmente de açúcares (carboidratos).

Nos extratos menos polares (hexano e clorofórmio) predominaram compostos triterpênicos e esteroidais, enquanto nos extratos mais polares (acetato e etanol) predominaram compostos fenólicos (que incluem os flavonóides e taninos).

Com base nos dados obtidos nos itens 4.1 a 4.3, considerando que *E. grandis* apresentou maior rendimento de extrato hexânico (menos polar) dentre os extratos obtidos nas duas etapas de extração, provavelmente essa espécie apresente predominância de compostos triterpênicos e esteroidais, enquanto que *E. urophylla* que apresentou maior rendimento de extrato etanólico, nas duas etapas de extração, apresente predominância de compostos fenólicos.

4.4 – Resultados dos testes de toxicidade

4.4.1 – Extrato hexânico

Os extratos hexânicos de *E. grandis* obtidos na primeira e na segunda etapa de extração das folhas da serapilheira, causaram mortalidade à *C. xanthus* em todas as concentrações nos testes preliminares, as quais variaram entre 0,01 e 0,04g/ 5g.

Novos testes foram realizados com os extratos hexânicos (concentrações menores – 0,01, 0,0025 e 0,005g/ 5g) e os valores de CL50 foram de 0,0048 e 0,0046g/ 5g na primeira e na segunda etapa de extração, respectivamente, valores estes muito próximos. Para os extratos após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha a CL50 observada foi de 0,0059g/ 5g para as duas etapas de extração, e novamente não foram observadas diferenças entre os efeitos dos extratos nas duas etapas.

Após 60 dias em contato com a lagoa, os extratos hexânicos das duas etapas de extração não apresentaram efeitos tóxicos aos organismos testados. Provavelmente após 60 dias em contato com a lagoa, as substâncias tóxicas tenham sido liberadas na água (Figura 44).

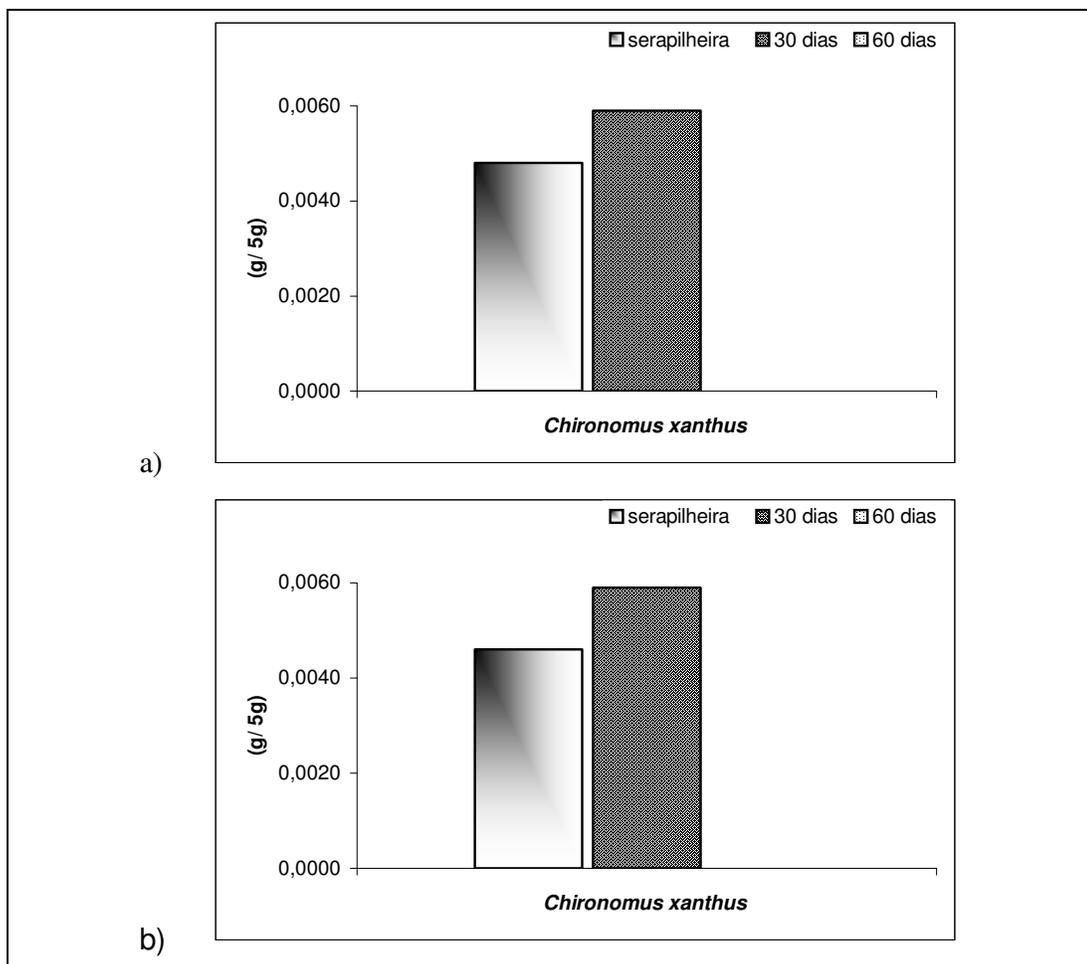


Figura 44 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato hexânico das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando *Chironomus xanthus*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Já no caso dos testes realizados com extrato hexânico extraído das folhas de serapilheira de *E. urophylla* nos dois períodos (chuvoso e seco), nas mesmas concentrações dos testes preliminares de *E. grandis* (0,01, 0,02 e 0,04g/ 5g), mostraram valores de CL50 0,0259g/ 5g na primeira extração e de 0,0308g/ 5g, na segunda extração, tendo sido verificado um menor efeito de toxicidade na segunda extração (Figura 45).

Um segundo teste montado com o extrato hexânico da segunda etapa de extração das folhas de serapilheira de *E. urophylla* apresentou CL50 de 0,0268g/5g, mostrando ligeira diferença comparado ao primeiro teste. Para o extrato das folhas após 30 dias da primeira e da segunda extração, não verificou-se efeito tóxico, e após 60 dias, o extrato hexânico não apresentou mais efeito de toxicidade em nenhuma das duas etapas de extração.

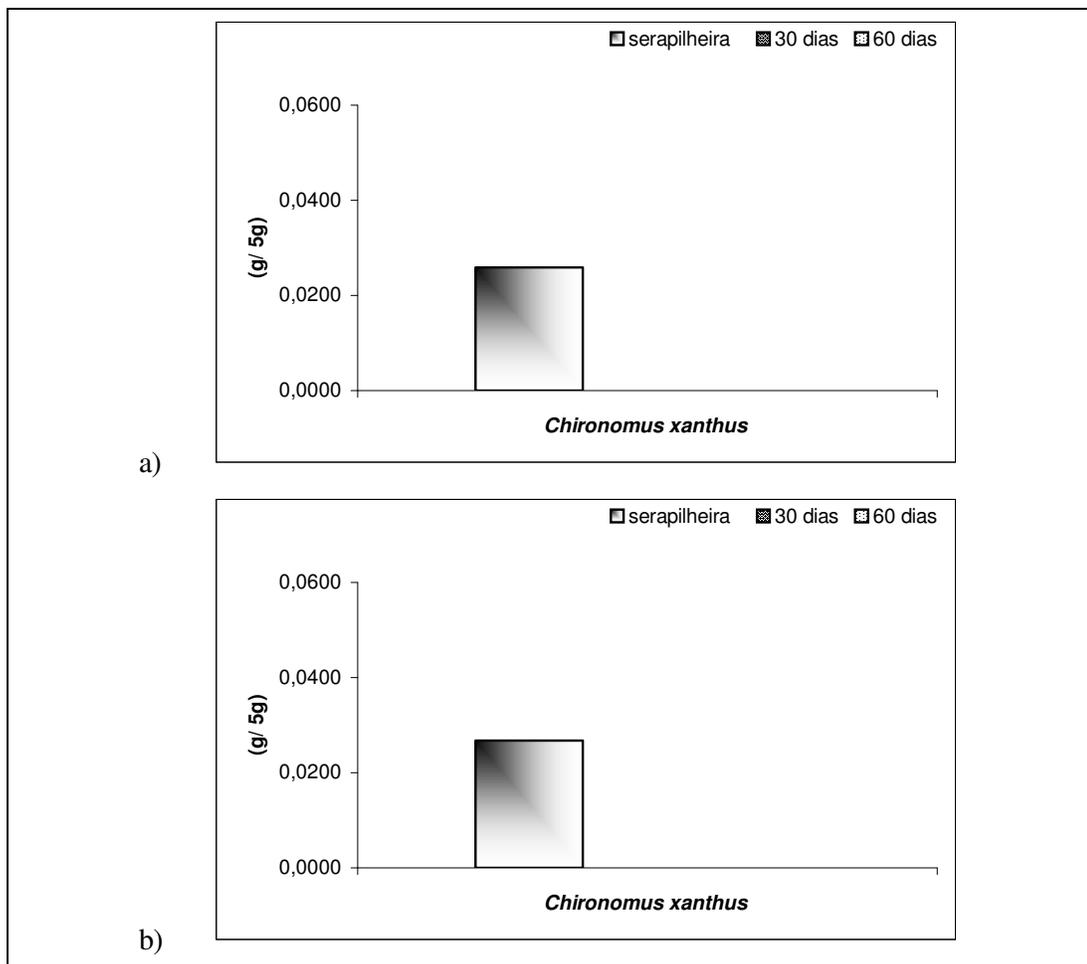


Figura 45 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato hexânico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Chironomus xanthus*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Pesquisas realizadas com extratos hexânicos têm evidenciado sua ação fungicida, demonstrando seu potencial para controle de microrganismos.

Um estudo realizado com extrato hexânico do falso Pau-Brasil (*Caesalpinia spinosa*) avaliou o efeito tóxico deste extrato no crescimento micelial de *Fusarium solani* e *Phoma tarda*. Os resultados mostraram o efeito inibitório (alelopátia) do extrato em porcentagens variáveis de 3,95% a 32,20% para *P. tarda* e de 7,29% a 33,83% para *F. solani*, com doses crescentes do extrato (FERREIRA, 2005).

De acordo com Carvalho et al. (1996), estudos sobre substâncias alelopáticas e a identificação das plantas que possuem princípios ativos capazes de causar algum efeito alelopático, é assunto de grande importância para a determinação de práticas culturais e de manejos mais adequados que evitem a interferência destas substâncias no crescimento de outras (GATTI et al., 2004) e na comunidade presente em ambientes terrestres e aquáticos.

Compostos químicos que muitas vezes apresentam efeito alelopático também podem ter efeitos genotóxicos e mutagênicos (NUNES e ARAÚJO, 2003).

Provavelmente o efeito de extratos hexânicos em ambiente aquáticos seja pequeno pois, substâncias apolares não possuem capacidade de se dissolver em água dificultando a sua liberação nesse ambiente, mas, quando dissolvidos, esses compostos podem causar uma diminuição na quantidade de organismos presentes em ambientes aquáticos pois possuem características fungicidas e bactericidas, dentre outras.

4.4.2– Extrato em clorofórmio

Os extratos clorofórmicos da serapilheira de *E. grandis* da primeira etapa de extração apresentaram CL50 0,0173 g/ 5g, enquanto na segunda extração não foi observado mortalidade em nenhuma das concentrações testadas.

Os extratos obtidos das folhas após 30 dias e 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha, não causaram mortalidade em nenhuma das concentrações, tanto na primeira quanto na segunda etapa de extração. Apenas na maior concentração (0,04g) do extrato obtido após 60 dias (primeira etapa), foi observada uma morte em 5 organismos.

Os extratos obtidos das folhas de *E. urophylla* da serapilheira e após 60 dias em contato com a lagoa na primeira extração, causaram mortalidade de apenas um organismo na maior concentração (0,03g/ 5g). Nas demais concentrações não foram verificadas mortalidades. Para os extratos obtidos das folhas após 30 dias, não foi observada mortalidade em nenhuma das concentrações, na primeira etapa da extração. Na segunda etapa, a CL50 foi de 0,020g/ 5g. O que pode ser observado é que o extrato clorofórmico possui um menor efeito de toxicidade que o extrato hexânico.

4.4.3 – Extrato em acetato de etila

Para os extratos de acetato de etila das folhas de serapilheira de *E. grandis* foram observados os seguintes valores: CL50 de 0,0122g/ 5g (primeira etapa de extração) e ausência de toxicidade aguda na segunda etapa de extração. Já após 30 dias em contato com a lagoa, verificou-se CL50 de 0,0097g/ 5g (primeira extração) .

Para o extrato das folhas após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha, não foi observado efeito de toxicidade na primeira etapa de extração, enquanto na segunda etapa de extração verificou-se CL50 de 0,0173g/ 5g (Figura 46).

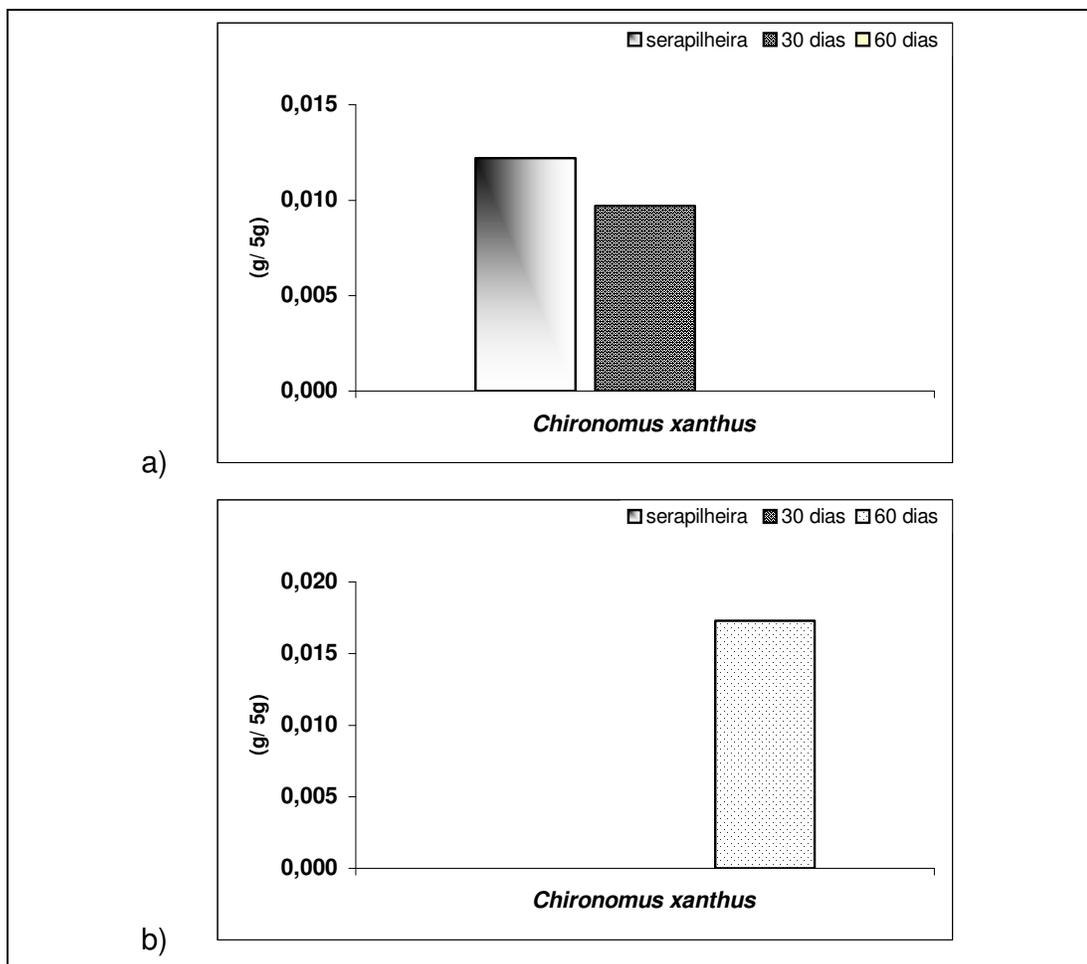


Figura 46 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato em acetato de etila das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando *Chironomus xanthus*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Os extratos em acetato de etila extraídos das folhas da serapilheira de *Eucalyptus urophylla* apresentaram CL50 de 0,0162g/ 5g (primeira etapa) e de 0,0084g/ 5g (segunda etapa), (Figura 47).

Para os extratos com as folhas após 30 dias em contato com a lagoa foi observado efeito de toxicidade, cuja CL50 foi de 0,0122g/ 5g no extrato da primeira etapa, na segunda etapa não foi observado efeito de toxicidade. Após 60 dias em contato com a água da lagoa, o efeito permaneceu o mesmo observado nos extratos

de folhas de *Eucalyptus urophylla* após 30 dias, ou seja, a CE50 encontrada foi de 0,0122g/ 5g para a primeira etapa.

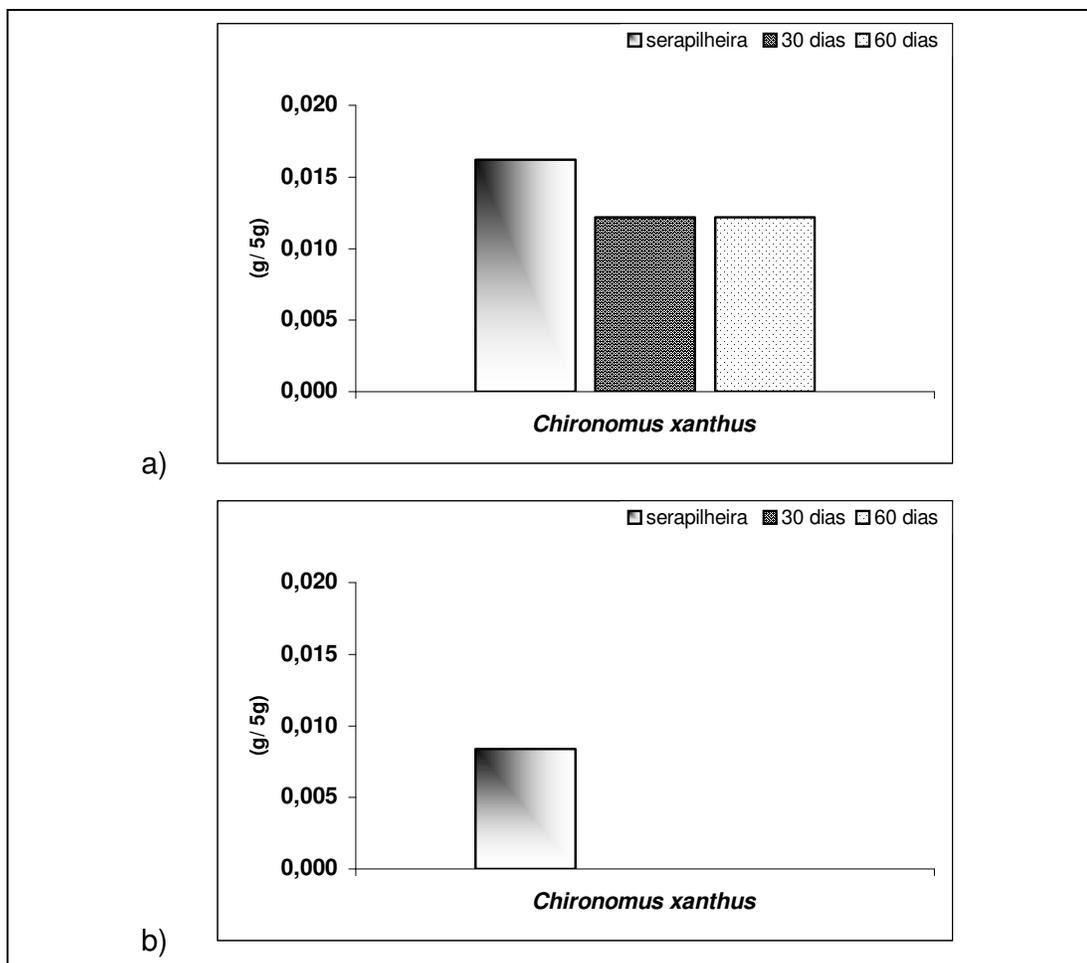


Figura 47 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato em acetato de etila das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Chironomus xanthus*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Estudo realizado com os extratos etanólico, acetato de etila e metanol de Bromeliácea (*Ananas erectifolius*) ainda pouco conhecida, forneceu informações sobre a espécie e possibilitou a investigação de seus constituintes químicos e sua atividade antimicrobiana, constatando-se que a atividade antimicrobiana está presente na fração hexânica. Quanto à composição química dos extratos, pode-se

detectar a presença de açúcares redutores, carotenóides, esteróides e triterpenóides, fenóis e taninos (SOUZA, 2004).

Um dos principais constituintes dos extratos com maior polaridade são os compostos fenólicos, os quais, mesmo em concentrações inferiores a 1 ppm, afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (ORTEGA, 1994).

Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da Comunidade Européia (VINCENT, 1991). Daí a necessidade de se avaliar as concentrações máximas permitidas para compostos fenólicos segundo o CONAMA 357.

4.4.4 – Extrato etanólico

Por apresentarem maior polaridade, os extratos etanólicos foram testados com os cladóceros *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*. O efeito observado no extrato das folhas de serapilheira de *E. grandis* no teste preliminar foi de imobilidade em todas as concentrações (entre 75 e 150 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$). No teste definitivo, utilizando *D. similis*, a CE50 foi de 82,23 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para o extrato da primeira etapa de extração e de 82,96 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para o da segunda etapa, as quais mostraram-se muito próximas. Para *D. laevis*, verificou-se CE50 de 75,51 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira etapa de extração e de 79,35 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda etapa (Figura 48). *D. laevis* se mostrou mais sensível que *D. similis*.

Nos testes com extratos das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa (Figura 48), verificou-se, para *D. similis*, CE50 de 113,88 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ nas duas extrações. Para *D. laevis* verificou-se CE50 138,48 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, nas duas extrações, mostrando menor efeito tóxico comparado a *D. similis*.

Já para os extratos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa, para a segunda etapa de extração (a primeira etapa foi perdida), verificou-se CE50 de 160,33 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. similis* e de 169,56 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. laevis*, tendo também sido observado um menor efeito tóxico à *D. laevis*.

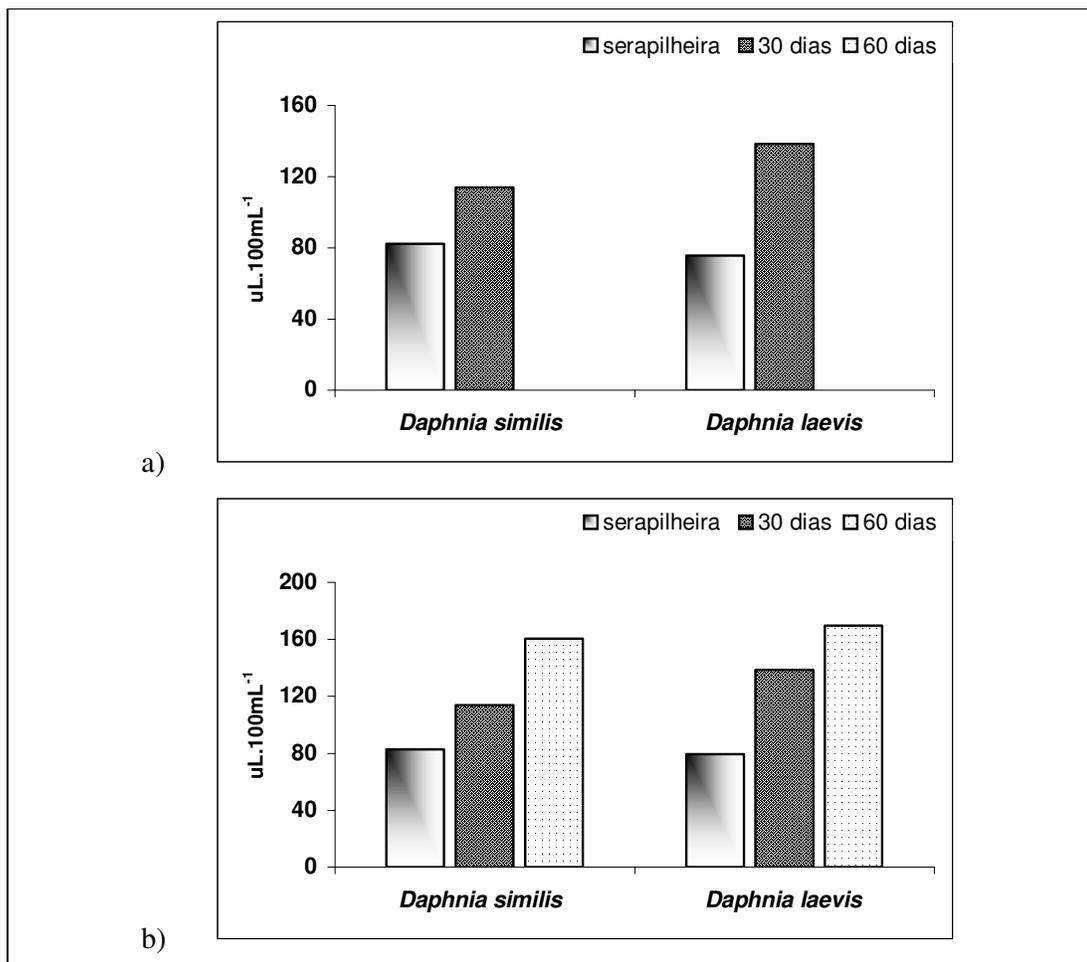


Figura 48 – Valores de CL50 ($\mu\text{g}/ 5\text{g}$) para os testes realizados com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Para *E. urophylla*, verificou-se efeito de toxicidade nos testes preliminares dos extratos das folhas de serapilheira, e após 30 e 60 dias em contato com a lagoa em todas as concentrações das duas etapas de extração (entre 50 e 200 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$).

Nos testes definitivos, verificou-se CE50 de 40,85 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira e segunda etapa de extração para *D. similis* e de 52,97 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 56,12 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira e segunda etapa de extração, respectivamente, para *D. laevis*, tendo novamente sido observado um menor efeito tóxico à *D. laevis* (Figura 49).

Após 30 dias, verificou-se CE50 de 95,25 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para a primeira etapa de extração e de 99,09 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para a segunda etapa utilizando *D. similis*. Já para *D. laevis*, os valores de CE50 para a primeira e a segunda etapa de extrações foi de 101,47 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 120,91 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, respectivamente, verificando-se que o extrato etanólico da primeira extração apresentou maior efeito tóxico comparado à segunda extração.

Quanto às folhas mantidas por 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha, apenas o extrato da segunda etapa de extração pode ser testado. Os valores de CE50 corresponderam a 116,75 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. similis* e 118,45 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. laevis*, como mostra a Figura 49.

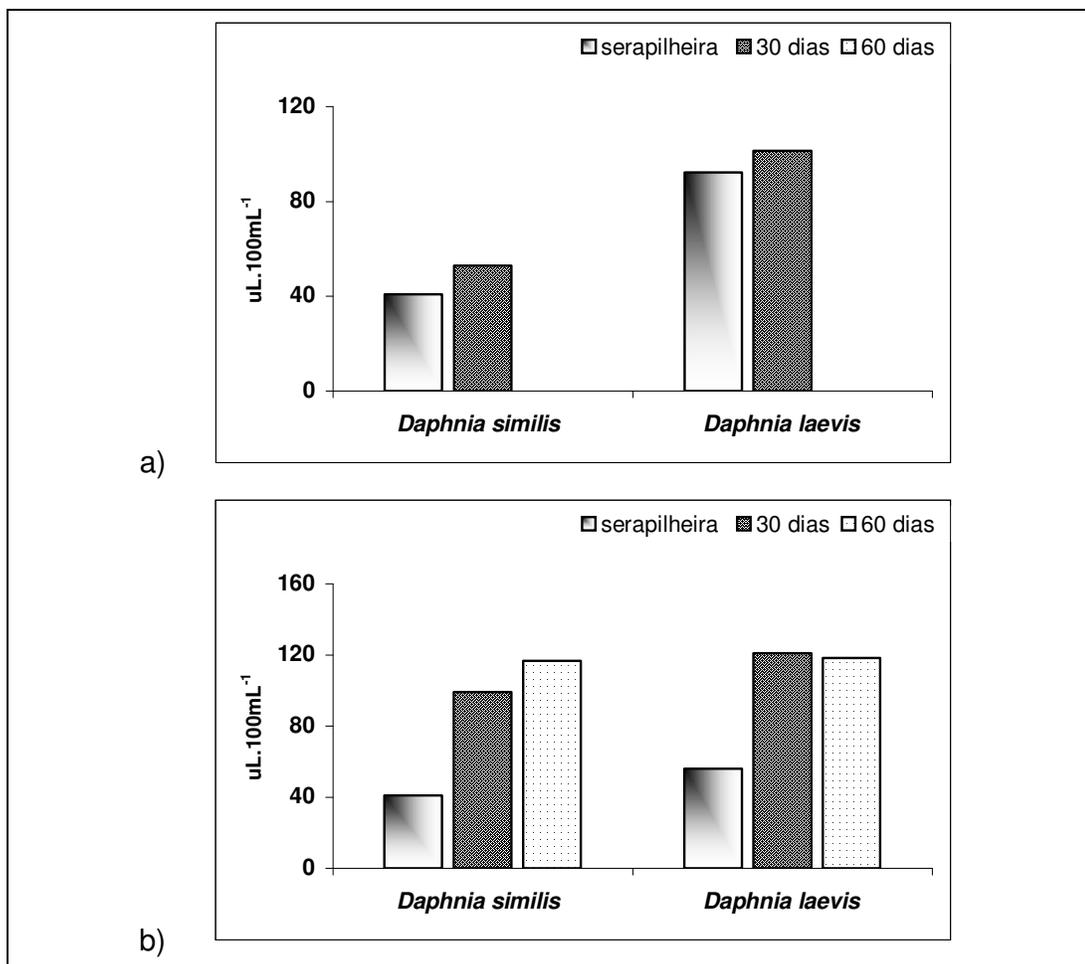


Figura 49 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato etanólico das folhas de *E. urphylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Um estudo realizado por Zanon (2005), avaliou a atividade larvídica do extrato etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* St. Hil., sobre *Culex quinquefasciatus*, na busca de novas alternativas para o controle do vetor mais importante da *Wuchereria bancrofti*. O extrato demonstrou atividade larvídica para todos as fases de desenvolvimento de *C. quinquefasciatus*. Os valores de CL50 encontrados para larvas de 1°, 2°, 3° e 4° instares foram de 20, 30, 40 e 60 mg/ 100 ml, respectivamente.

Como observado no estudo realizado por Zanon (op.cit) o extrato etanólico apresenta atividade larvicida e provavelmente atividades bactericidas, fungicidas entre outras que quando em contato com o ambiente, tanto aquático como terrestre, podem causar imobilidade ou mortalidade de organismos, diminuindo a riqueza e abundância desses organismos, alterando os processos biológicos.

4.4.5 – Extrato aquoso

Nos testes realizados com o extrato aquoso das folhas de serapilheira de *E. grandis* (apenas da segunda etapa de extração), verificou-se CE50 de 465,12 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. similis* e de 731,40 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. laevis*, ou seja, um menor efeito tóxico do que o observado para *D. similis* (Figura 50).

Após 30 dias, o efeito de toxicidade foi menor do que o observado para os extratos com as folhas da serapilheira. Para *D. similis*, a CE50 foi de 639,47 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira e segunda etapa de extrações enquanto para *D. laevis* ficou acima de 800 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$. Em novo teste realizado, verificou-se CE50 de 913,41 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$.

Para os extratos após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha, não foi observado efeito de toxicidade em nenhuma das concentrações (entre 0,005 a 0,03g/5g) com nenhum dos dois organismos-teste. Novos testes preliminares, indicaram CE50 acima de 3000 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ tanto para *D. similis* quanto para *D. laevis*. Nos testes definitivos, verificou-se CE50 de 6674,20 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. similis*, tanto na primeira quanto na segunda extração e de 7071,06 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para *D. laevis*, na primeira e segunda extração (Figura 50).

Verificou-se que os extratos aquosos tiveram seu efeito tóxico diminuído em função da permanência nas lagoas, indicando que as substâncias presentes nos mesmos foram facilmente liberadas quando em contato com a água das lagoas.

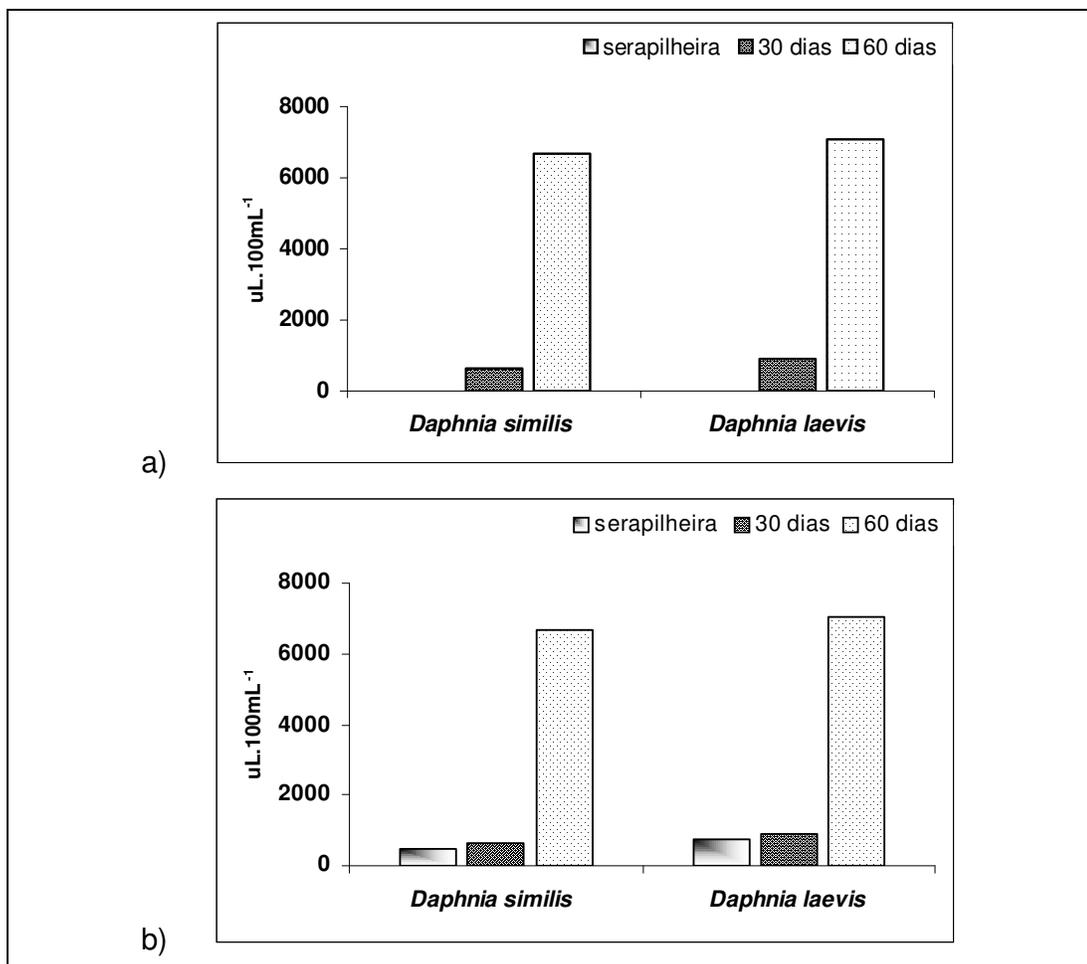


Figura 50 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Palmeirinha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Quanto a *E. urophylla*, verificou-se CE50 de $387,30 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ a partir das folhas da serapilheira para *D. similis* na primeira extração e de $432,27 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ na segunda extração. Já para *D. laevis*, verificou-se CE50 de $670,82 \mu\text{L} / 100\text{mL}$ para a primeira etapa de extração e de $720,78 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, na segunda etapa (Figura 51). Em ambos os casos, verificaram-se maior efeito tóxico na primeira etapa de extrações.

Após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha, os testes com extratos aquosos mostraram CE50 de $578,24 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e $540,74 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ na primeira e segunda extração, respectivamente, para *D. similis*, e de $649,70 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, para *D. laevis*, tanto na primeira como na segunda extração.

Para os extratos após 60 dias, verificou-se para *D. similis*, CE50 de 5612,31 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 5853,10 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ para a primeira e a segunda etapas de extração respectivamente, e de 6674,19 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ e 6404,43 $\mu\text{L}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, para *D. laevis*, para a primeira e segunda etapas respectivamente (Figura 51). Verificou-se ainda que com o passar do tempo, o efeito tóxico do extrato aquoso foi diminuindo.

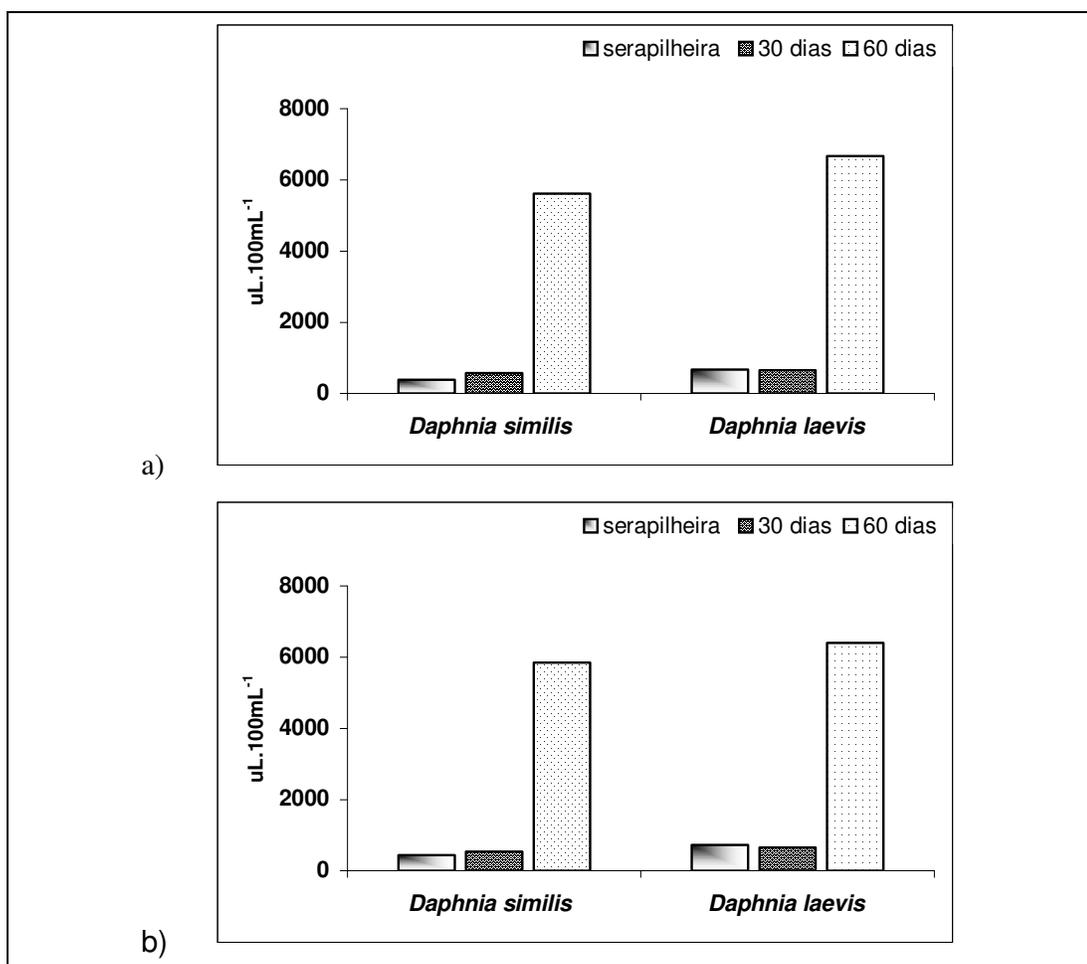


Figura 51 – Valores de CL50 (g/ 5g) para os testes realizados com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* da serapilheira, e 30 e 60 dias após mantidas na Lagoa Ferruginha, utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*: (a) e (b) correspondem a primeira e segunda etapas de extração.

Alguns extratos aquosos têm apresentado efeito alelopático sobre várias plantas, tais como alface, arroz e plantas daninhas como desmódio (*Desmodium adscendens*), guanxuma (*Sida rhombifolia*) e assa-peixe (*Vernonia polyanthes*),

inibindo a germinação e afetando o crescimento radicular das plantas (KUO et al., 1982; SOUZA FILHO et al., 1997). Entretanto, a maioria das pesquisas sobre alelopatia, refere-se apenas ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, não considerando os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas no sistema da planta. (PRASAD e SUBHASHINI, 1994).

4.4.6 – Validade dos testes

Os resultados de todos os ensaios mantiveram-se dentro do percentual adotado para imobilidade ou mortalidade, inferior ou igual a 10% para os organismos do controle. Nos ensaios de toxicidade realizados, verificou-se 100% de sobrevivência dos organismos.

5 – CONCLUSÕES

1. *E. grandis* apresentou maior rendimento de extrato hexânico dentre os extratos obtidos nas duas etapas de extração, enquanto *E. urophylla* apresentou maior rendimento de extrato etanólico, nas duas etapas de extração;
2. As classes de compostos identificados nos testes químicos dos extratos de *E. urophylla* foram saponina (folhas 60 dias) e os esteróides e triterpenos na maioria dos extratos analisados. Flavonóides, taninos e fenóis foram detectados principalmente nos extratos mais polares, e provavelmente esses compostos são mais tóxicos aos organismos aquáticos;
3. Para *E. grandis*, os compostos identificados foram: saponinas, esteróides e triterpenos, em praticamente todos os extratos analisados, além de taninos que são polifenóis com propriedade germicida muito forte;
4. Os extratos aquosos apresentaram menor efeito de toxicidade aguda dentre os extratos considerados, e sua toxicidade diminuiu em função do tempo de exposição das folhas de eucaliptos nas lagoas, para ambas as espécies;
5. Nos extratos menos polares (hexânico e clorofórmico) predominaram compostos triterpênicos e esteroidais, enquanto nos extratos mais polares (acetato de etila, etanólico e aquoso) predominaram os compostos fenólicos que incluem os flavonóides e taninos;
6. O extrato hexânico apresentou maior efeito de toxicidade aguda quando comparado com outros extratos apolares como o extrato clorofórmico e de acetato de etila;
7. Os extratos etanólico e aquoso apresentaram menor efeito tóxico à *D. laevis*, indicando menor sensibilidade desta espécie comparada à *D. similis*.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, verificou-se que os compostos naturais de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* testados, incluindo água de decomposição, óleos essenciais e extratos de diferentes polaridades, apresentaram efeito tóxico aos organismos-teste (cladóceros e bentônicos) mesmo em pequenas concentrações, provavelmente em função das substâncias presentes nesses compostos naturais, a exemplo do fenol.

Embora este estudo tenha sido realizado em laboratório, possivelmente esses efeitos sejam observados *in situ*. Os baixos teores de nutrientes encontrados nas duas lagoas estudadas, Palmeirinha e Ferruginha, caracterizando-as como ambientes oligotróficos, podem, em parte, estar relacionados à baixa taxa de decomposição (mineralização) da matéria orgânica, uma vez que durante o processo de decomposição, as folhas de *Eucalyptus* spp liberam substâncias que inibem ou dificultam a ação de organismos responsáveis pela decomposição, levando a uma maior interação de organismos detritívoros com substâncias tóxicas.

No Brasil, o CONAMA estabelece em até 0,003 mg L⁻¹ C₆H₅OH, como concentração máxima de fenóis totais permitidos em águas de classe I e II (água doce), para que não haja um efeito sobre a biota aquática. Porém, observou-se neste estudo, que em concentrações bem menores (µL), particularmente os extratos mais polares com maior presença de compostos fenólicos, apresentaram efeito tóxico a todos os organismos-teste utilizados em laboratório (*D. similis*, *D. laevis*, *C. silvestrii* e *C. xanthus*).

A quantidade de 3g de folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* em bequeres de 500 mL, ou seja 0,006 g.mL⁻¹ apresentou efeito tóxico principalmente no período de 15 dias de decomposição. Já no caso dos óleos essenciais, a porcentagem extraída das folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* nas duas etapas de extração ficou entre 0,22 e 0,68% do total de folhas utilizadas na extração (entre 48,37 e 301,40 gramas). No caso dos extratos, as porcentagens extraídas foram maiores variando de 0,3 a 19,9% do total de folhas utilizadas na extração (entre 14,15 e 33,20 gramas, dependendo da polaridade dos extratos e do período de extração, mas na maioria dos casos foi observado efeito tóxico aos organismos-teste, particularmente

nos extratos menos polares. Levando-se em conta que uma folha pesa em média entre 0,2 e 0,4 g e representa aproximadamente 0,0038 m², se extrapoladas as concentrações utilizadas, massas utilizadas e efeitos observados nos diferentes experimentos, constatar-se-á que são condizentes com condições encontradas no campo.

Assim, é importante o monitoramento de ambientes aquáticos circundados por plantios de *Eucalyptus* spp, através de parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e biológicos, possibilitando avaliar os impactos causados por esse tipo de monocultura, e subsidiar medidas mitigadoras.

Neste contexto, incluem-se a manutenção de distância mínima para áreas de plantio localizadas ao redor de ambientes aquáticos, tendo como base para avaliação o recuo estabelecido pela legislação vigente, além da utilização de barreiras contendo espécies nativas para evitar ou diminuir a entrada de folhas de serapilheira de *Eucalyptus* em ambientes aquáticos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (2004). Associação Brasileira de Normas Técnicas, Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de Ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea), dezembro de 2004.
- ABNT (2005). Associação Brasileira de Normas Técnicas, Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônico – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Cladocera, Crustácea), dezembro de 2004.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1998) — Standard methods for the water and wastewater. 20. ed. New York: APHA.
- ABELHO, M.; GRAÇA, M.A.S. (1996). Effects of eucalyptus afforestation on leaf litter dynamics and macroinvertebrate community structure of in Central Portugal. *Hydrobiologia*, vol. 324, p. 195 – 204.
- ADAMS, R. P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Carol Stream: Illinois,.
- ADAMS, M. A.; ATTIWILL, P.M.; (1996). Nutrient cycling an nitrogen mineralization in eucalypt forests south-eastern Australia. I. Nutrient Cycling and nitrogen turnover. *Plant and Soil*, v.92, p.319-339, 1986.
- ALLAN, J.D. (1976). Lifehistory patterns in zooplankton. *The American Naturalist*, v.110, n.971, p.165-180.
- ALLAN, J.D. (1995). Stream ecology, structure and function of running waters. Chapman e Hall, London.
- ALEXANDER, M. (1977). Introducion to soil microbiology. New York, John Wiley e Sons, 467p.
- ALMEIDA, F.S. (1988). A alelopatia em plantas, Londrina, IAPAR, Circular, v. 55, 62p. 1988.
- ANDRADE, C.A. (2003). Estudo ecotoxicológico no trecho médio da bacia do Rio Doce – MG, dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2003.
- ARSUFFI, T.L.; SUBERKROPP, K. (1985). Selective feeding by stream caddisfly (*Trichoptera*) detritivore on leaves with fungal colonized patches, *Oikos*, 45, pp. 50-58.
- ASHTON, O.H. (1975). Studies of litter in *Eucalyptus regans* forest. *Australian Journal of Botany*, 23: 413-33, 1975.

ATKINS, P. (2001). Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente/ Peter Atkins e Loretta Jones; trad. Igenz Caracelli *et al.* – Porto Alegre: Bookman, 2001.

BARBIERI, A.F.; GUERRA, C.B.; TORRES, H.G.; SIMÕES, R.F.; REIS, A.V.; SCLIAR, C.; ABDO, R.O.O.; LINS, S.E.B. (1997). Atividades Antrópicas e Impactos Ambientais. In PAULA, J. A. Biodiversidade, população e economia de uma região de mata atlântica. Belo Horizonte. UFMG/Cedeplar, p. 273 – 343.

BARLOCHER, F.C. CANHOTO, M.A.S., GRAÇA (1995). Fungal colonization of alder and eucalypt leaves in two streams in Central Portugal. Arch. Hydrobiol 113: 457 – 470.

BARRICHELO, L.E.G. (1995). O eucalipto no contexto florestal brasileiro. Revista Ecologia e Desenvolvimento, v. 5, n. 54, 1995, pág. 23.

BAUDIN, J.P. & NUCHO, R. (1992). ⁶⁰Co accumulation from sediment and planktonic algae by midge larvae *Chironomus luridus*. Environ. Pollution. v.76. p. 333-140, June.

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. (1991). Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: INKATA/ACIAR/CSIRO, 1991. 247 p.

BRADOW, J. M.; CONNICK, W. J. (1990). Volatile seed germination inhibitor from plant residues. J. Chem. Ecol., v. 16, p. 645-666,.

BRAGA, H.C. (1971). Óleos essenciais do Brasil: estudo econômico. Rio de Janeiro. Editora Ministério da Agricultura. 1971. 158p.

BRAGA, N.P. (2002). Influência da secagem no rendimento e na composição do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus citriodora*. Campinas, 2002. 151p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

BRANCO, S.M. (1999). A Água, Meio Ambiente e Saúde. In: REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G., orgs. Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Escrituras. Cap. 7, p. 227-247.

BROWNING, B. L. (1963). The chemistry of wood. New York: John Wiley, 1963. 689 p.

BUIKEMA, A.L.Jr. e SHERBERGER, S.R. (1977). *Daphnia carolina* Tips Vol. XL nº10 – Carolina Biological Supply Company, ISSN 0045-5865.

BUNN, S.D.H. EDWARD e N.R. LONERAGAN. (1985). Spatial and temporal variation in the macroinvertebrate fauna of stream of the northern jarrah forest, Western Australia: community structure. Freshwater. Biol 16: 67 – 91.

BURTON, G.A.Jr. (1992). Sediment toxicity assessment. 1 ed. Lewis Publishers.

CAIRNS, J.J.; PRATT, J.R. (1990). The scientific basis of bioassays. In: MUNAWAR, M. et al. – Environmental bioassay Techniques and their Application. Kluwer Academic Publishers, Dordecht, 05-20p.

CALLISTO, M. e ESTEVES, F. A., (1995), Distribuição da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita, Lago Batata (Pará, Brasil). *Oecologia Brasiliensis*. v. 1. Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas Brasileiros. F. A. Esteves (ed.), pp. 281-291, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CALLISTO, M; BARBOSA, F.A.R. & MORENO, P. (2000). Macrobenthic diversity on different habitats in an altitudinal lake surrounded by *Eucalyptus* plantation and secondary Atlantic forest (Southeast Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia* 12: 55-61.

CALLISTO, M; BARBOSA, F.A.R. & MORENO, P. (2002). The influence of *Eucalyptus* plantation on the macrofauna associated with *Salvinia auriculata* in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 62: 63-68. 255.

CANHOTO, C.; GRAÇA, M.A.S., (1995). Food value of introduced eucalypt leaves for a Mediterranean stream detritivore. *Tipula lateralis*, *Freshwat. Biol.* 34: 209 – 214.

CANHOTO, C. (2001). *Eucalyptus globulus* leaves: morphological and chemical barriers to decomposition in streams, PhD Thesis, Zoology Department, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

CÂMARA, C.D. (1999). Efeitos do corte raso do eucalipto sobre o balanço hídrico e a ciclagem de nutrientes em uma microbacia experimental. Piracicaba, 1999. 75p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – USP.

CETESB (1994), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Teste de Toxicidade com *Daphnia similis* Claus, 1876, Método de Ensaio, L5.018, março de 1994.

CETESB (1999), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Métodos de Avaliação da Toxicidade de poluentes a Organismos Aquáticos, Volume I, São Paulo, 1999.

CETESB (2006), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Métodos de Avaliação da Toxicidade de poluentes a Organismos Aquáticos, Volume 2, São Paulo, 2006.

CHAIBI, A.; ABABOUC, L. H.; BELASRI, K.; BOUCETTA, S.; BUSTA, F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. *Food Microbiology*, London, v. 14, p. 161-174, 1997.

-
- CHAPMAN, D.V. (1989). Concepts and strategies for biological monitoring London. GEMS Monitoring and Assessment Research Center, 1989. 25p.
- CHAVES, M. Eucalipto fará o Jequitinhonha de SP? (2003). Jornal Estado de São Paulo, 08 de março de 2003.
- CINIGLIO, G., (1993). In: Eucaliptus para a produção de óleos essenciais, ESALQ-USP, Piracicaba.
- COHEN, D.M. (1970). How many recent fishes are there? Proc. Calif. Acad. Sci, v. 37, p. 265 – 273.
- COLLIS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (1997). Introdução a Métodos Cromatográficos, 7ed. Campinas – SP: Editora da UNICAMP.
- CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005. Resolução nº 357, 17/04/2005. São Paulo.
- COMMON, I. F. B. (1981), Some factors responsible for the imbalances in the Australian fauna of Lepidoptera. Journal of the Lepidopterists' Society 4: 286-294
- COMMON, I. F. B. (1990). Moths of Australia. Melbourne University Press, Carlton, 535 pp.
- COMMON, I. F. B. (1994). *Oecophorine genera of Australia I. The Wingia Group*. Monographs in Australian Lepidoptera 3; CSIRO Publications, Melbourne, 390 pp.
- CONNER, A. H.; RONE, J. W. (1975). Extractives in Eastern Hardwoods: a review. Forest Products Laboratory, Ottawa, v. 18, p. 1-6, 1975.
- COWEL, E.B.; ANDERSON, J.W. (1979). Marine environmental research. International Journal. England, Applied Science Publishers, v.2, 1979.
- DE PAULA, J.A. (1997). Biodiversidade, população e economia: uma região de mata Atlântica. UFMG/Cedeplar; ECMXC; PADCT/CIAMB, 672p.
- DEL MORAL, K.L.; MULLER, C.E. (1970). The allelopathic effects of eucalyptus camadulenis. American midland naturalist, 83(1): 160-200, 1970.
- DELA BRUNA, E. (1985). A serrapilheira de eucaliptos: efeitos de componentes antibacterianos e de nutrientes na decomposição. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1985, 52 p. Tese (M.S.).
- DELLA BRUNA, E., FERNANDES, B., BORGES, A.C., ALMEIDA FILHO, J. & BARROS, N.F. (1989). Efeito do extrato de serrapilheira de *Eucalyptus* sobre o crescimento microbiano. Pesq. Agropecu. bras. 24:1523-1528.

DELLA BRUNA, E., BORGES, A.C., FERNANDES, B., BARROS, N.F. & MUCHOVEJ, R.M.C. (1991). Atividade da microbiota de solos adicionados de serapilheira de eucalipto e de nutrientes. R. bras. Ci. Solo 15:15-20.

DEVÁI, G., 1990, Ecological background and importance of the change of chironomid fauna in shallow Lake Balaton. *Hidrobiologia*, 191: 189-198.

DOMMERGES, Y.; MANGENOT, F. (1970). Ecologie microbienne du sol. Paris, Masson et Cia. Editeurs, 1970. 797p.

DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. (1990). Tropical red gums: a source of 1,8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. New Forest, Dordrecht, n. 4, p. 157-178, 1990.

DORAN, J.C. (1991). Commercial sources, uses, formation and biology. In BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Inkata, 1991. p. 11-28.

DORNFELD, C.B. (2002). Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). Dissertação (Mestrado), 260p. + anexo, Escola de Engenharia de São Carlos – EESC – Universidade de São Paulo.

DUARTE, L.D. (2000). “Estudo Químico, estrutural e da Atividade Antibacteriana de Triterpenos Pentacíclicos isolados dos Galhos e Raízes de *Austroplenckia populnea*”. Tese de Doutorado. Departamento de química, ICEX, UFMG.

EDWARDS, P.B. WANJURA, W.J. (1990). Physical attributes of eucalypt leaves and the host range of Chrysmelid beetles, Symp. Biol Hung., 39, pp.227-236.

EDWARDS, P.B. WANJURA, W.J.; brown, w.v. (1993). Selective herbivory by Chismas beetles in response to intraspecific variatin in Eucalyptus terpenoids. Oecologia, 95, pp. 551-557.

EINHELLIG, F.A. (1995). Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. Pp. 96-116 In: Inderjit; K.M.N. Dakshini & F.A. Einhellig. Allelopathy, organisms, process and applications. American Chemical Society, Washington.

ELDER, J.F. (1990). Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment. U.S.Geological Survey Circular. Denver,. v.1049, 49p.

ELDRIDGE, K; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK; G. (1994). Eucalypt domestication and breendig. New York: Oxford University Prees, 288 p.

EYRE, F.H.; (1980). Forest cover types of the United States and Canada. Washington, DC: Society of American Foresters, 148 p.

ESTEVEZ, F.A. (1988). Fundamentos de Limnologia. Editora Interciência/FINEP. Rio de Janeiro. 575p.

-
- EVANS, J. (1992). *Plantation Forestry in the Tropics*. Oxford University Press, Oxford, 403 pp.
- EWEL, J. J. (1976). Litter fall and leaf decomposition in a tropical forest succession in eastern Guatemala. *Journal of Ecology*, v. 64, p. 293-308.
- FACELLI, J. M. (1991). PICKETT, S. T. A. Plant litter: its dynamics and effects on plant community structure. *The Botanical Review*, v. 57, p. 1-32.
- FAO, (1981). *El eucalipto en la repoblación forestal*. Roma, 747 p.
- FARMER, R. H. *Chemistry in the utilization of wood*. Oxford: Pergamon Press, 1967. v. 9.
(Pergamon series of monographs on furniture and timber).
- FERREIRA, A.G. e AQUILA, M.E.A. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12(Edição especial): 175-204.
- FLORENZANO, C. (1957). Ricerche sui terreni coltivati ad eucalitto (II – Ricerche microbiologiche e biochimiche). *Publicazione Del Centro Di Sperimentazione Agrícola Florestali*, 1: 131-52.
- FONSECA, A.L. (1997). *Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba/SP, através de testes de toxicidade com invertebrados*. 216p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- FREAR, D.E. e BOYD, J.E. (1976). Use of *Daphnia magna* for the microbiassay of pesticides. I development of standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage mortality curves for pesticides. *J. Econ. Entomol.* 50: 1228-1236.
- GAMA, M.M.; MURIAS DOS SANTOS, A.F.A.; NOGUEIRA, A. (1989). Comparaison de la composition de populations de collemboles de peuplements d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) et de chêne-liège (*Quercus suber*), 3rd International Seminar on Aptergota, Siena (Italy), pp. 339-345.
- GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F. (2002) Ciclagem de nutrientes em floresta natural e em plantios de eucalipto e de dandá no sudeste da Bahia, Brasil. *Revista Árvore*, v.26, n.2, p.193-207.
- GENSSER, M.; CHAUVET, E.; DOBSON, M. (1999). A perspective on leaf litter breakdown in streams, *Oikos*, 85, pp. 377-384.
- GEORGE, L. (1982). Litter production and nutrient return in eucalyptus hybrid plantation. *Indian Forestry*, 103(4): 252-60.
- GESSNER, M., CHAUVET, E. (1994). Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter, *Ecology*, 75, pp. 1807-1817.

- GIRARD, E.A. (2005). Volume biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) m floresta ombrófila mista. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.
- GIESY, J.P. (1988). A comparison of three sediment bioassay method using Detroit river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.7, p.483-498.
- GOLFARI, L. (1975). Zoneamento ecológico do Estado de Minas Gerais para reflorestamento. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestais da Região de Cerrado, 1975. 65 p. (Série Técnica, 3).
- GRAÇA, M.A.S. (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review, *Internat. Rev. Hydrobiol*, N 86, pp. 383-393.
- GRANDI, R. A. P. (1993). Hyphomycetes associados à folhas em decomposição de *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg. e *Euterpe edulis* Mart. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GRANJA, A. Acácia negra e tanino. (1986). Roessléria, Porto Alegre, v. 8, n. 1. p. 1-71, 1986. (Comunicação Técnica).
- GUENTHER, E. (1972). The production of essential oil: methods of distillation on, effleurage, maceration, and extraction with volatile solvante, In: GUENTHER, E. The essential oils. 2 ed. New York: Robert E. Krieger, 1972. v.1.
- GUENTHER, E. (1977). History, Origin in Plants, Production and Analysis. In: The Essential Oils, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.1.
- GUENTHER, E.(1977). Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: The Essential Oils, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.4.
- GUIMARÃES, R.L. (2004). Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* no Vale do Rio Doce, MG. Monografia de Bacharelado, UFMG Belo Horizonte-MG.
- GUO, L.B.; SIMS, R.E.H. (1999). Litter production and nutrient return in New Zealand eucalypt short-rotation forest: implication for land management. *Agriculture Ecosystems and Environment*, v. 73, p. 93-100, 1999.
- HARBORNE, J.B. (1993). *Ecological Biochemistry*. 4 ed.: London: Academic.
- INDERJIT & DAKSHINI, K.M.N. (1995). Algal Allelopathy. *The Botanical Review - The New York Botanical Garden* 61(1): 28-44.
- INGERSOLL, C.G.; ANKLEY, G.T.; BENOIT, D.A.; BRUSON, E.L.; BURTON, G.A.; DWYER, F.J.; HOKE, R.A.; LANDRUM, P.F. NORBERT-KING, T.J.; WINGER, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates a review of methods and applications. *Environment Toxicology and Chemistry*. 14 (11): 1885-1894p.

- JENSEN, V. (1974). Decomposition of angiosperm tree leaf litter. In: DICKINSON, C.H. & PUGH, G.J.F. eds. *Biology of Plant Litter Decomposition*. London, Academic Press, 1974. v.1. 241p.
- KIRA, T.; SAZANAMI, H. (1995). Utilização de recursos hídricos e problemas de gerenciamento de lagos. In: HASHIMOTO, M.; BARRETT, B. F. D. Diretrizes para o Gerenciamento de Lagos. ILEC – UNEP, vol. 2, p. 1-5.
- KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURAME, K.; TAKAHARA, V. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural Biology and Biochemistry*, 45(4): 945-52.
- LAMPRECHT, H. (1989). *Silviculture in the Tropics*. Paul Parey Verlag, Hamburg, 296 pp.
- LAURINI, L. (1979). – Toxicologia dos Inseticidas. Sarvier, São Paulo, SP, 1979, Cap.3, 51-67p.
- LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. Wood structure and composition. New York: Marcel Dekker, 1991. 488 p.
- LIMA, W. P. (1993). Impacto ambiental do eucalipto. São Paulo: EDUSP, 1993. 301 p.
- LIMA, W.P. (1996). Impacto Ambiental do Eucalipto – 2ª ed. – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996.
- LIMA, W.P.; ZAKIA, M.J.B. (1998). Implicações da colheita florestal e do preparo do solo na erosão e assoreamento de bacias hidrográficas. In: GONÇALVES, J.L.M. (Ed.) Conservação e cultivo de solos para plantações florestais. Piracicaba: IPEF, 2002, cap.11, p.373-391.
- LOUZADA, J.N.C. et al. (1997). Litter decomposition in semideciduous forest and *Eucalyptus spp.* crop in Brazil: a comparison. *Forest Ecology and Management*, v.94, p.31-36, 1997.
- MAFFEIS, A.R., SILVEIRA, R.L.V.A. E BRITO, J.O. (2000). Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*, *Scientia Florestalis*, 57, 87-98.
- MARQUES JÚNIOR, O.G.; ANDRADE, H.B.; RAMALHO, M.A.P. (1996). Avaliação de procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e estimação de parâmetros genéticos e fenótipos na região noroeste do estado de Minas Gerais. *Cerne* 2(1): 12-19.
- MATSUMURA-TUNDISI, T. (1984). Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil. *Hydrologia* 112: 161 –165.
- MAZZAFERA, P. (2003). Efeito Alelopático do Extrato Alcoólico do Cravo-da-Índia e Eugenol. *Revista Brasileira Botânica*, vol. 26, nº 2, São Paulo, Junho de 2003.

McCOOL, J.G. (1966). Accession and decomposition of litter in spotted gum forests. *Australian Forestry*, 30(2): 191-8, 1966.

MELLO, C.L. (1997). Sedimentação e tectônica cenozóica no médio Vale do Rio Doce (MG, sudeste do Brasil) e suas implicações na evolução de um sistema de lagos. São Paulo, SP. Tese de doutorado. Instituto de Geociências – Universidade de São Paulo.

MEYBECK, M.; HELMER, R. (1992). A introduction to water quality. In: CHAPMAN, D. (Ed.). *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*. London: Chapman and Hall, 1992. cap.1, p 1-17.

MOYLE, P.B.; LEIDY, R.A. (1992). Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. In: FIEDLER, P. L.; JAIN, S. K. (Ed.). *Conservation biology: the theory and practice of nature conservation, preservation and management*. New York: Chapman & Hall, p. 128-169.

MOLINA, A.; REIGOSA, M.J. CABALLEIRA, A. (1991). Release of allelochemical agents from litter, throughfall, and topsoil in plantations of *Eucalyptus globulus* Labill in Spain, *J. Chem. Ecol.*, 17 pp. 147-160.

MOLOFSKY, J.; AUGSPURGER, C. K. (1992). The effect of litter on early seedling establishment in a tropical forest. *Ecology*, v. 73, p. 68-77.

MONTAGNINI, F.; JORDAN, C. F. (2002). Reciclaje de nutrientes. In: GUARIGUATA, M. R.; KATTAN, G. H. (Eds.). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Cartago: Ediciones LUR, 2002. p. 167-191.

MORETTO, E.M. (2001). Diversidade zooplanctônica e variáveis limnológicas das regiões limnética e litorânea de cinco lagoas do Vale do Rio Doce – MG, e suas relações com o entorno / Evandro Matheus Moretto. São Carlos, 2001.

MORI, F. A. (1997). Produção de adesivos para madeira com taninos da casca de *Eucalyptus grandis*. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MOURA, A.L.; GARCIA, C.H. (2000). *A Cultura do Eucalipto no Brasil*. São Paulo: SBS, 112 p.

MOURA, V. P. G. et al. (1980). Avaliação de espécies de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1980. 104p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de Pesquisa, 1).

NAGY, L.A.; MACAULEY, B.J. (1982). *Eucalyptus* leaf-litter decomposition, effects of relative humidity and substrate content. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 233-6.

OYEDEJI, A.O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O.; ADENIYI, B.A.; KOENIG, W.A. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*, v.70, p.526-528, 1999

- OLIVEIRA-NETO, A.L.; BOTTA-PASCHOAL, C.M. (2000). Sensibilidade do cladóceros lacustre planctônico *Ceriodaphnia silvestrii* (Família Daphnidae) aos metais cádmio, cromo e chumbo. *Ecotoxicologia: Perspectiva para o século XXI*. Rima Editora, 2000, p. 537-544.
- ORTEGA, F.; DOMÍNGUEZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.; *J. Chromatogr., A* (1994), 675, 65.
- PAGANO, S.N.; DURIGAN, G. (2000). Aspectos da ciclagem de nutrientes em matas ciliares do Oeste do Estado de São Paulo, Brasil. In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F. (Eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 2000. p.109-123.
- PAMPLIN, P.A.Z. (1999). Avaliação da qualidade ambiental da represa de Americana (SP-BRASIL) com ênfase no estudo da comunidade de macroinvertebrados bentônicos e parâmetros ecotoxicológicos. São Carlos. 88p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- PASCHOAL, C.M.R.B. (2002) Avaliação ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da bacia do Rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação de AIT – avaliação e identificação da toxicidade, 146 p. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- PASTORE JUNIOR, F. P. (1977). Produção de adesivos à base de tanino. Brasília: Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal, 1977. 9 p. (Comunicação Técnica, 19).
- PELCZAR, Michael; REID, Roger e CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo: Editora McGraw-Hill Ltda, Volume 1, 1980.
- PELD. (2005). Programa de estudos de longa duração – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.
- PEREIRA, H.C. (1973). *Land Use and Water Resources*. London. Cambridge University Press. 246p.
- PEREIRA, V.P. (1997). Solo: manejo e controle de erosão hídrica. Jaboticabal: FCAV, 1997. 56 p.
- PERSOONE, G.; JANSSEN, C.R. (1995). Freshwater invertebrate toxicity testes. In: CALOW, P.; (ed) *Handbbook of Ecotoxicology*, Cap. 4, p.51 – 65.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. (2001). Potencial alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre semestres de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. *Floresta e Ambiente*, v.8., nº 1, p. 130-136, 2001.

POGGIANI, F.; SCHUMACHER, M.V. (2000). Ciclagem de nutrientes em florestas nativas. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds.). Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba: IPEF, 427p.

POZO, J.; BASAGUREN, A.; ELOSEGUI, A.; MOLINERO, J., FABRE, E.; CAHAUVET, E. (1998). Afforestation with *Eucalyptus globulus* and leaf litter decomposition in streams of northern of northern Spain, *Hydrobiologia*, 373, pp. 101-109.

PRATES, H. T. et al. (1998). Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998a.

PUTNAM, A. R. (1983). Allelopathy; a break in weed control? *Am. Fruit Grower*, v. 103, n. 6, p. 10,.

PUTNAM, A. R.; DeFRANK, J. Use of allelopathy cover to inhibit weeds. In: CONGRESS PLANT PROT, 1981, Mineapolis. Proceedings. Mineapolis: 1981. p.508-582.

RAND, G.M. (eds) (1995). Fundamentals of aquatic toxicology – effects, environmental fate, and risk assessment. Flórida, Taylor & Francis.

REBOUÇAS, A.C. (1999). Água Doce no Mundo e no Brasil. In REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. eds. Águas Doces no Brail. São Paulo. Escrituras Editora.

RECORD, S.J.; HESS, R.W. (1949). Timbers of the new world. New Haven: Yale University Press, 1949. 640p.

REYNOLDSON, T.B. & DAY, K.E. (1993). Freshwater sediments. In: CALOW, P. (Ed.). Handbook of Ecotoxicology. Beackwell Science. Sheffield, Oxford. 83-100p.

REZENDE, J.L.P.; GARCIA, Q.S.; SCOTTI, M.R.M.M.L. (2001). Laboratory decomposition of *Dalbergia nigra* all. ex. benth and *Eucalyptus grandis* w.hill ex. maiden leaves in forest and eucalypt plantation soils. *Acta Bot. Bras.*, Sept./Dec. 2001, vol.15, no.3, p.305-312. ISSN 0102-3306.

RICE, E.L. (1984). Allelopathy, London, Academic Press Inc.,.

RICE, E. L. (1987). Allelopathy: an overview. In: WALLER, G.R. Allelochemical role in agriculture and forestry. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1987. p. 722. (ACS. Symposium Series, 330).

RICE, E. L. (1987). Allelopathy: an overview. In: WALLER, G.R. Allelochemical role in agriculture and forestry. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1987. p. 722. (ACS. Symposium Series, 330).

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. (1997). Farmacognosia e farmacobiocotecnologia. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

RODRIGUES, M. 2004. "Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus spp* no Vale do Rio Doce, Minas Gerais" Relatório apresentado ao Programa de Aprimoramento Discente (PAD- UFMG), Belo Horizonte, MG .

RODGER, S. (2001). Estudo Ecotoxicológicos e Limnológicos nos Reservatórios em Cascata do Médio e Baixo Rio Tietê: uma análise espacial e temporal. 213p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

ROGICK, A. (1996). Efeitos ambientais do eucalipto. Revista Ecologia e Desenvolvimento, v. 5, n. 59, 1996, pág. 38-41.

ROMANI, R.A. , (1972). In: Óleos essenciais de eucalipto, ESALQ-USP, Piracicaba.

SABARÁ, M.G. (1994). Avaliação dos impactos do plantio de *Eucalyptus spp.* sobre dois lagos naturais no médio Rio Doce, MG: propostas de mitigação e manejo. Dissertação de Mestrado, UFMG, programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, MG, 156 pp.

SAMPAIO, A.N. (1957). Eucaliptos para o Brasil. Revista Arquivos do Serviço Florestal, v. 12, 1957.

SAMPIETRO, D.A. Alelopatia: conceito, características, metodologia de estudio e importancia. Disponível em:
<http://fai.enne.edu.ar/biologia/alelopatia/alelopatia.htm> Acesso em: 15 ago. 2006.

SANTOS, O.M.; GRISI, B.M. (1979). Decomposição da celulose e do folheto em solo de floresta no sul da Bahia: Estudo comparativo em áreas queimadas e na queimada. Revista Brasileira de Ciências do Solo, 3: 149-53, 1979.

SANTOS, I.S. (2001). Fungos micorrízicos arbusculares em ambiente de mata atlântica e de Eucaliptos na região de Entre Rios, Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SATCHELL, J.E. (1974). Litter-interface of animate/inanimate matter. In: DICKISON, C.H. & PUGH, G.J.F. Biology of plant litter decomposition. London, Academic Press, 1974. v.1 241p.

SCHUMACHER. M.V. (1992). Aspectos da ciclagem de nutrientes e do microclima em talhões de *Eucalyptus camadulensis* Dehnh, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Eucalyptus torelliana* F. Muell. 1992. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

-
- SILVA, P.H.M.; BRITO, J.O.; SILVA JUNIOR, F.G (2006). Potencial de onze espécies de eucalipto para produção de óleos essenciais. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, jan./fev. 2006, vol.63, no.1, p.85-89. ISSN 0103-9016.
- SIMÕES, C.M.O. et al. (1999). *Farmacognosia: da panta ao medicamento*, Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 1999, 821 p.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. (2000). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000.
- SINGH, J.S.; GUPTA, S.R. (1977). Plant decomposition and soil respiration terrestrial ecosystems. *The Botanical Review*, 43(4): 449-528.
- SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. *Floresta e Ambiente*, v.7, p.190-197, 2000.
- STEIBERG, P.D. (1988). Effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 120, pp. 221-237.
- STRIXINO, S.T. e STRIXINO, G. (1982). Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). *Rev. Brás. Ent.* 26, 183-189.
- SUBERKROPP, K., KLUG, M.J. (1976). Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*, 57, pp. 707-719.
- TATE, C. M. & HEINY, J. S. (1995). The ordination of benthic invertebrate communities in the South Platte River Basin in relation to environmental factors. *Freshwater Biology*, 33: 439-454.
- TAUK, S. M. (1990). Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. *Revista Brasileira de Geociências*, São Paulo, v.20, n.1-4, p.299-301 1990.
- TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (1981); *Estudos Limnológicos no Sistema de Lagos do Médio Rio Doce*, Minas Gerais, Brasil.
- TUNDISI, J.G. (1988). *Limnologia e manejo de represa*. Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos – SP, v.2.
- TUNDISI, J.G.; BARBOSA, F. A. R. (1995). Conservation of Aquatic Ecosystems: Present Status and Perspectives. In: TUNDISI, J. G.; BICUDO, C. E. M.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Eds. *Limnology in Brazil*. Rio de Janeiro, ABC/SBL.

TUNDISI, J.G. (1997). A Note on the Effect of Rainfall in the Process of Stratification and Stability in the Rio Doce Lakes. In: TUNDISI, J. G.; SAIJO, Y., eds. Limnological Studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil. Brazilian Academy of Sciences. University of São Paulo. School of Engineering at São Carlos. Center for Water Resources and Applied Ecology.

TUNDISI, J.G.; SAIJO, Y., HENRY, R.; NAKAMOTO, N. (1997a). Primary Productivity, Phaytoplankton Biomass and Light Photosynthesis Responses in Four Lakes. In: TUNDISI, J.G., SAIJO, Y., eds. Limnological Studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil. Brazilian Academy of Sciences. University of São Paulo. School of Engineering at São Carlos. Center for Water Resources and Applied Ecology.

TUNDISI, J.G. (1999). Limnologia no século XXI: perspectiva e desafios. São Carlos, SP. IIE.

TRUGILHO, P.F.; MORI, F.A.; LIMA, J.T.; CARDOSO, D.P. (2003). Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus* spp. Nota Técnica / *Technical Note*

USEPA, U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1994). USEDPA/600/R – 94/024. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington. D. C., 133p.

USEPA, U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R-99/064.250p.

VIANA, M.B. (2004). O eucalipto e os efeitos ambientais do seu plantio em escala. Câmara do Deputados, Brasília.

VIEIRA FILHO, S. A. (2002). “Estudo fitoquímico, em folhas e sâmaras de *Austroplenckia populnea*. Avaliação da atividade antiespermatogênica do extrato hexânico”. Estudo fitoquímico em triterpenos pentacíclicos. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: UFMG, ICEX, Química.

VITTI, A.M.S., BRITO, J.O. (1999). Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedência e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. *Scientia Florestalis*, **56**, 145-154.

VONO, V. e BARBOSA, F.A.R. (2001). Habitats and littoral zone fish community structure of two natural lakes in Southeast Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 61: 371-379.

WALLER, G.R. (1999). Introduction. In: F.A. Macias; J.C.G. Galindo; J.M.G. Molinillo & H.G. Cutler (eds.). Recent advances in allelopathy. Cádiz, Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz, v.1.

ZAGATTO, P.A., GOLDSTEIN, E. G., BERTOLETTI, E., LOMBARDI, C. C., MARTINS, M. H. R. B. (1985). Ensaio biológicos com organismos aquáticos: toxicidade de água e sedimento de rios da região de Cubatão. In: 13^o CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Maceió. Anais, p 1-11.

ZAGATTO, P.A. (1999). Ecotoxicologia Aquática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA. Florianópolis, 1999. Mini-curso, Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 124p.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (2006). Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. ISBN – 85-7656-090-9.

ZUCKER, W. V. (1993). Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist*, Lancaster, v. 121. n. 3. p. 335-365, Mar. 1993.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela 1 – Soluções para o preparo do meio de cultura.

Solução	Reagente	Quantidade mg	Preparo
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
2	KNO_3	10 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
4	K_2HPO_4	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 625	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6 250	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 250	
7	NaHCO_3	15 000	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada

Tabela 2 – Volume das soluções para o preparo de 1 L do meio de cultura.

Solução	1	2	3	4	5	6	7
Volume (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0

ANEXO II - FOLHAS DE DECOMPOSIÇÃO

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais – 18/11/2006) da primeira água de decomposição (4 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros e macroinvertebrados bentônicos.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	6,81	160,00	6,29	28,80
EG 100%	5,88	295,00	1,87	66,70
EG 50%	6,41	191,30	5,07	49,60
EG 25%	6,65	169,50	5,92	61,60
EU 100%	6,93	202,00	2,62	45,18
EU 50%	7,03	173,00	4,71	44,21
EU 25%	7,09	166,00	5,42	53,41

*Oxigênio dissolvido

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais – 21/11/2006) da segunda água de decomposição (7 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros e macroinvertebrados bentônicos.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,76	276,0	5,76	32,82
EG100%	6,26	266,0	3,40	56,25
EG50%	6,85	196,5	4,24	37,52
EG25%	7,02	177,0	4,94	45,28
EU100%	163,7	163,7	2,77	53,26
EU50%	157,8	157,8	4,15	48,25
EU25%	173,2	173,2	4,84	37,95

*Oxigênio dissolvido

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais – 29/11/2006) da terceira água de decomposição (15 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros e macroinvertebrados bentônicos.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,65	276,0	6,35	32,82
EG100%	6,26	266,0	3,40	56,25
EG50%	6,40	196,5	4,34	37,52
EG25%	7,02	178,2	5,07	44,32
EU100%	163,7	163,7	3,15	53,26
EU50%	157,8	159,3	4,15	47,65
EU25%	173,2	173,2	4,84	37,95

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais – 18/01/2007) da quarta água de decomposição (34 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros e macroinvertebrados bentônicos.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	6,85	166,00	6,32	32,82
EG 100%	7,12	190,00	4,43	35,60
EG 50%	7,07	182,00	5,53	37,52
EG 25%	7,06	172,00	6,20	35,60
EU 100%	7,52	202,00	4,13	37,80
EU 50%	7,32	186,00	6,16	36,90
EU 25%	7,22	181,00	6,17	36,75

*Oxigênio dissolvido

Tabela 5 – Parâmetros físicos e químicos (final – 20/11/2006) da primeira água de decomposição (4 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	8,04	182,00	6,27	36,00
EG100%	7,49	282,00	4,25	53,40
EG50%	7,79	257,00	5,49	47,50
EG25%	7,84	246,00	6,16	49,29
EU100%	7,87	285,00	5,44	45,18
EU50%	8,00	208,00	5,85	44,21
EU25%	7,83	191,30	6,09	53,41

Tabela 6 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 23/11/2006) da segunda água de decomposição (7 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,25	173,0	6,2	41,08
EG100%	7,33	200,0	4,05	41,08
EG50%	7,43	155,3	5,20	40,80
EG25%	7,52	113,0	5,80	36,50
EU100%	7,84	194,0	5,53	45,18
EU50%	7,84	182,1	5,41	28,00
EU25%	7,80	216,0	5,60	28,76

*Oxigênio dissolvido

Tabela 7 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 01/12/2006) da terceira água de decomposição (15 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,80	198,0	6,34	36,65
EG100%	7,38	167,5	5,63	37,85
EG50%	7,35	201,0	5,43	36,94
EG25%	7,57	190,0	5,56	39,11
EU100%	7,63	201,0	5,90	36,78
EU50%	7,70	262,0	5,40	35,95
EU25%	7,84	297,0	5,36	36,58

*Oxigênio dissolvido

Tabela 8 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 20/01/2007) da quarta água de decomposição (34 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	8,07	185,0	6,67	36,52
EG 100%	7,50	198,6	5,37	52,36
EG 50%	7,90	167,0	5,93	-
EG 25%	7,99	177,0	5,97	47,52
EU 100%	8,15	185,0	5,80	53,24
EU 50%	8,20	172,0	6,20	-
EU 25%	8,19	189,5	6,45	45,25

Tabela 9 – Parâmetros físico-químicos (finais – 22/11/2006) da primeira água de decomposição (4 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizada nos testes de toxicidade com macroinvertebrado (*Chironomus xanthus*).

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD** (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,76	276,0	5,76	36,00
EG 100%	7,60	216,0	4,62	53,40
EG 100%*	7,49	194,7	4,55	47,50
EG 50%	7,66	175,7	5,10	49,29
EG 25%	7,76	178,0	5,53	45,18
EU 100%	7,77	256,0	5,45	43,68
EU 100%*	7,73	285,0	5,41	44,51
EU 50%	7,84	193,2	5,70	44,21
EU 25%	7,89	184,4	5,86	53,41

* Sem sedimento

**Oxigênio dissolvido

Tabela 10 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 25/11/2006) da segunda água de decomposição (7 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com macroinvertebrados bentônicos (*Chironomus xanthus*).

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD** (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,25	173,0	6,20	36,72
EG 100%	7,33	154,4	5,64	38,65
EG 100%*	7,33	200,0	4,05	36,95
EG 50%	7,43	155,3	5,20	37,25
EG 25%	7,52	113,0	5,80	28,76
EU 100%	7,84	194,0	5,53	27,63
EU 100%*	7,83	211,0	5,14	45,11
EU 50%	7,84	182,0	5,41	45,11
EU 25%	7,80	216,0	5,60	4,11

* Sem sedimento

**Oxigênio dissolvido

Tabela 11 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 03/12/2006) da terceira água de decomposição (15 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com macroinvertebrados bentônicos (*Chironomus xanthus*).

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD** (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,80	198,0	6,34	36,00
EG 100%	7,38	167,5	5,63	38,42
EG 100%*	7,35	201,0	5,43	37,85
EG 50%	7,57	190,0	5,56	36,94
EG 25%	7,63	201,0	5,90	39,11
EU 100%	7,70	262,0	5,40	36,78
EU 100%*	7,84	297,0	5,36	35,95
EU 50%	7,60	191,0	5,93	36,58
EU 25%	7,78	193,0	5,90	36,71

* Sem sedimento

**Oxigênio dissolvido

Tabela 12 – Parâmetros físicos e químicos (finais – 22/01/2007) da quarta água de decomposição (34 dias) das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* utilizadas nos testes de toxicidade com macroinvertebrados bentônicos (*Chironomus xanthus*).

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD** (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,82	190,4	6,31	37,65
EG 100%	7,45	198,0	5,29	54,65
EG 100%*	7,38	202,0	5,15	-
EG 50%	7,60	173,6	5,45	-
EG 25%	7,79	166,0	5,58	41,52
EU 100%	7,64	202,0	5,15	56,98
EU 100%*	8,02	210,0	5,60	-
EU 50%	7,84	193,7	5,45	-
EU 25%	7,80	193,5	6,13	44,14

* Sem sedimento

**Oxigênio dissolvido

ANEXO III – ÓLEOS ESSENCIAIS

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,00	160,0	6,49	32,65
EG 1,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,28	163,0	6,16	37,58
EG 2,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,34	155,0	6,61	-
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,32	163,5	6,30	-
EG 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,32	164,5	6,30	39,88
EU 1,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,24	146,7	6,56	36,98
EU 2,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,29	164,5	6,68	-
EU 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,30	159,2	6,34	-

*Oxigênio dissolvido.

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,00	160,0	6,49	35,68
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,75	168,1	5,60	36,97
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,85	169,8	5,74	-
EG 10,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,77	174,1	5,70	32,86
EU 2,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,13	166,1	5,70	28,75
EU 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,66	182,0	5,65	-
EU 7,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,80	170,8	5,42	36,97

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 30 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,25	161,32	7,41	36,02
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,89	151,5	6,55	-
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,89	165,4	6,29	-
EG 10,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,92	144,1	6,19	-
EU 2,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,98	174,0	6,27	-
EU 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,93	174,4	6,40	-
EU 7,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,98	174,3	6,26	-

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos óleos essenciais das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,79	172,5	6,28	36,72
EU 2,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,39	166,6	6,47	32,86
EU 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,34	167,3	6,50	-
EU 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,29	159,6	6,30	-
EU 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,23	165,7	6,03	28,76
EU 2,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,40	166,6	6,47	-
EU 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,39	167,3	6,50	-
EU 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,33	159,6	6,30	-
EU 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,31	166,5	6,04	46,35

Tabela 5 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 60 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,93	158,6	6,34	36,72
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,12	167,2	5,78	32,86
EG 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,23	167,9	6,26	-
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,36	167,1	6,27	-
EG 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,33	168,1	6,64	38,76
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,09	167,8	5,63	-
EG 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,26	168,5	6,85	-
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,34	166,2	6,24	-
EG 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,37	167,5	5,98	39,54

ANEXO IV – ÓLEO ESSENCIAL

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
1 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
2 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
3 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
4 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
1 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
2 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
3 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
4 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	10	0	0
1 μ L.100mL ⁻¹	10	0	0
2 μ L.100mL ⁻¹	10	0	0
3 μ L.100mL ⁻¹	10	0	0

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
1 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
2 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
3 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	24	0	0
3,0µL.100mL ⁻¹ *	24	3	12,5
5,0µL.100mL ⁻¹ *	24	10	41,6
10,0µL.100mL ⁻¹ *	24	24	100
3,0µL.100mL ⁻¹	24	4	16,7
5,0µL.100mL ⁻¹	24	10	41,6
10,0µL.100mL ⁻¹	24	24	100

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	24	0	0
2,5µL.100mL ⁻¹ *	24	10	41,6
5,0µL.100mL ⁻¹ *	24	20	83,3
7,5µL.100mL ⁻¹ *	24	24	100,0
2,5µL.100mL ⁻¹	24	10	41,6
5,0µL.100mL ⁻¹	24	18	75,0
7,5µL.100mL ⁻¹	24	24	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 7 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira de extração utilizando *D. laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0
2,5µL.100mL ⁻¹ *	14	6	42,8
5,0µL.100mL ⁻¹ *	14	11	78,6
7,5µL.100mL ⁻¹ *	14	14	100,0

Tabela 8 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
3,0µL.100mL ⁻¹ *	16	3	18,7
5,0µL.100mL ⁻¹ *	16	6	42,8
10,0µL.100mL ⁻¹ *	16	16	100,0
3,0µL.100mL ⁻¹	16	3	18,7
5,0µL.100mL ⁻¹	16	7	50,0
10,0µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 9 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0
3,0µL.100mL ^{-1*}	14	3	21,4
5,0µL.100mL ^{-1*}	14	8	57,1
10,0µL.100mL ^{-1*}	14	14	100,0
3,0µL.100mL ⁻¹	14	3	21,4
5,0µL.100mL ⁻¹	14	7	50,0
10,0µL.100mL ⁻¹	14	14	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 10 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
2,5µL.100mL ^{-1*}	16	4	25,0
5,0µL.100mL ^{-1*}	16	10	71,4
7,0µL.100mL ^{-1*}	16	16	100
2,5µL.100mL ⁻¹	16	5	35,7
5,0µL.100mL ⁻¹	16	9	64,3
7,0µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 11 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0
2,5µL.100mL ^{-1*}	14	4	28,6
5,0µL.100mL ^{-1*}	14	7	50,0
7,0µL.100mL ^{-1*}	14	14	100,0
2,5µL.100mL ⁻¹	14	4	28,6
5,0µL.100mL ⁻¹	14	6	42,8
7,0µL.100mL ⁻¹	14	14	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 12 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0
3,0 μ L.100mL ⁻¹	14	2	
4,0 μ L.100mL ⁻¹	14	6	
5,0 μ L.100mL ⁻¹	14	11	
6,0 μ L.100mL ⁻¹	14	24	

Tabela 13 – Controle dos testes ecotoxicológicos com óleos essenciais de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *D. similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
2,0 μ L.100mL ^{-1*}	16	4	25,0
3,0 μ L.100mL ^{-1*}	16	7	43,7
4,0 μ L.100mL ^{-1*}	16	9	56,2
6,0 μ L.100mL ^{-1*}	16	16	100,0
2,0 μ L.100mL ⁻¹	16	5	31,2
3,0 μ L.100mL ⁻¹	16	6	37,5
4,0 μ L.100mL ⁻¹	16	9	56,2
6,0 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 30 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	7,00	160,0	6,85	36,55
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,67	163,0	6,85	37,69
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,82	166,5	6,20	-
EG 10,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,83	162,9	5,80	44,12
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,78	163,9	6,83	-
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,81	163,9	6,16	-
EG 10 $\mu\text{L.100ml}^{-1}$	7,82	163,9	5,98	-
EU 2,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,60	166,0	5,99	31,63
EU 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,75	161,5	5,70	-
EU 7,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1*}$	7,73	166,3	5,76	41,78
EU 2,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,76	166,0	5,76	-
EU 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,78	161,5	6,30	-
EU 7,5 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,76	166,3	5,70	-

*Primeira etapa de extração.

Tabela 7 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos óleos essenciais das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 60 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) das duas etapas de extração utilizados nos testes de toxicidade com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle				41,08
EG 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,78	175,9	6,00	41,08
EG 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,92	177,1	6,06	-
EG 5,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,94	177,3	6,01	-
EG 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,98	177,8	5,98	57,51
EU 2,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,99	178,4	6,37	41,08
EU 3,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	7,96	178,1	6,18	-
EU 4,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	8,01	176,4	6,03	-
EU 6,0 $\mu\text{L.100mL}^{-1}$	8,00	163,1	5,96	53,40

ANEXO V – EXTRATO HEXÂNICO

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	8,01	205,1	5,76	36,90
Controle - Sd.	7,93	176,0	6,33	33,00
0,01g/5g*	7,68	238,10	6,59	37,85
0,02g/5g*	7,66	194,5	6,43	-
0,05g/5g*	7,65	182,3	6,75	39,65
0,01g/5g	7,68	238,1	6,59	36,52
0,02g/5g	7,66	194,5	6,43	-
0,05g/5g	7,65	182,3	6,75	37,52

* Primeira Etapa

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	8,01	205,1	5,76	36,90
Controle - Sd.	7,93	176,0	6,33	33,00
0,01g/5g*	7,81	188,0	6,21	41,08
0,02g/5g*	7,89	186,0	6,01	41,08
0,04g/5g*	7,90	188,0	6,17	41,08
0,01g/5g	7,84	187,0	6,33	36,95
0,02g/5g	7,79	183,0	6,21	35,99
0,04g/5g	7,87	180,0	6,25	40,13

* Primeira Etapa

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
Controle	8,01	205,10	5,76	36,90
Controle - Sd.	7,93	176,0	6,33	33,00
0,01g/5g*	7,74	167,0	5,96	-
0,02g/5g*	7,93	178,0	6,47	-
0,04g/5g*	7,90	175,0	5,95	36,90
0,01g/5g	8,07	182,0	6,55	33,00
0,02g/5g	8,05	185,0	6,00	-
0,04g/5g	8,06	167,0	6,56	37,01

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. urophylla* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,75	205,10	5,76	36,90
Controle - Sd.	7,93	176,0	6,65	33,00
0,02g/5g	7,47	199,0	6,78	-
0,03g/5g	7,60	200,0	5,87	-
0,04g/5g	7,66	201,0	6,23	37,12

Tabela 5 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 30 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,83	168,40	6,64	41,12
Controle - Sd.	7,10	160,2	7,14	36,99
EG0,01g/5g*	7,69	273,0	6,64	42,53
EG0,005g/5g*	7,69	192,0	6,32	-
EG0,0025g/5g*	7,69	196,1	6,84	39,98
EG0,01g/5g	7,69	273,0	6,64	-
EG0,005g/5g	7,69	192,8	6,32	-
EG0,0025g/5g	7,69	196,1	6,84	-
EU0,01g/5g*	7,73	183,0	6,65	41,14
EU0,02g/5g*	7,80	175,0	6,38	-
EU0,01g/5g	7,73	183,0	6,65	-
EU0,02g/5g	7,80	175,0	6,38	42,55

* Primeira Etapa

Tabela 6 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos hexânicos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,83	168,4	6,64	36,03
0,002g/5g*	7,76	197,3	6,58	-
0,005g/5g*	7,80	196,7	6,12	-
0,015g/5g*	7,65	201,1	6,02	44,36
0,002g/5g	7,46	198,8	6,56	-
0,005g/5g	7,83	199,8	6,27	-
0,015g/5g	7,60	200,1	6,01	41,96

* Primeira Etapa

ANEXO VI - EXTRATO HEXANICO

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de *E. grandis* das folhas da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,01g/ 5g*	5	5	100,0
0,02g/ 5g*	5	5	100,0
0,04g/ 5g*	5	5	100,0
0,01g/ 5g	5	5	100,0
0,02g/ 5g	5	5	100,0
0,04g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de *E. grandis* das folhas da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,0025g/ 5g*	5	0	0
0,005g/ 5g*	5	3	60,0
0,01g/ 5g*	5	4	80,0
0,0025g/ 5g*	5	0	0
0,005g/ 5g*	5	3	60,0
0,01g/ 5g*	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de *E. urophylla* das folhas da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,01g/ 5g*	5	1	20,0
0,02g/ 5g*	5	1	20,0
0,04g/ 5g*	5	5	100,0
0,01g/ 5g	5	0	0
0,02g/ 5g	5	0	0
0,04g/ 5g	5	4	80,0

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de *E. urophylla* das folhas após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,02g/ 5g	5	1	20,0
0,03g/ 5g	5	3	60,0
0,04g/ 5g	5	5	100,0

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de *E. urophylla* das folhas após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,01g/ 5g*	5	0	0
0,03g/ 5g*	5	0	0
0,04g/ 5g*	5	0	0
0,01g/ 5g	5	0	0
0,03g/ 5g	5	0	0
0,04g/ 5g	5	0	0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato hexânico de das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0
0,002g/ 5g*	5	0	0
0,005g/ 5g*	5	0	0
0,015g/ 5g*	5	0	0
0,002g/ 5g*	5	0	0
0,005g/ 5g*	5	0	0
0,015g/ 5g*	5	0	0

*Primeira etapa de extração.

ANEXO VII - EXTRATO CLOROFÓRMICO

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos clorofórmico das folhas de *E. grandis* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD*. (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,70	161,3	7,15	36,85
EG 0,03g/5g*	7,90	153,0	5,28	42,65
EG 0,01g/5g *	7,67	128,0	5,70	-
EG 0,005g/5g *	8,09	193,0	6,16	-
EG 0,03g/5g	7,95	145,0	4,45	-
EG 0,01g/5g	8,06	759,0	5,72	-
EG 0,005g/5g	8,01	191,6	6,08	41,23

*Primeira etapa.

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos clorofórmico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com *Chironomus xanthus*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD*. (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,11	160,71	7,14	36,58
EG 0,04g/5g *	8,09	133,0	6,63	44,56
EG 0,01g/5g *	8,00	134,0	6,15	-
EG 0,005g*/5g	7,95	197,0	6,78	-
EG 0,04g/5g	8,03	137,0	5,76	-
EG 0,01g/5g	8,14	168,0	5,84	-
EG 0,005g/5g	8,10	197,0	6,16	45,63

ANEXO VIII - EXTRATO CLOROFORMICO

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato clorofórmico das folhas de *E. grandis* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	1	20,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,03g/ 5g*	5	0	0,0
0,005g/ 5g	5	1	20,0
0,01g/ 5g	5	0	0,0
0,03g/ 5g	5	-	0,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato clorofórmico das folhas de *E. grandis* após 30 em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,04g/ 5g*	5	0	0,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,01g/ 5g	5	0	0,0
0,04g/ 5g	5	0	0,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato clorofórmico das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,003g/ 5g	5	1	20,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	1	20,0
0,004g/ 5g	5	0	0,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato clorofórmico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,03g/ 5g*	5	1	20,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,01g/ 5g	5	1	20,0
0,04g/5g	5	1	20,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato clorofórmico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	-	0,0
0,04g/ 5g*	5	1	20,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,01g/ 5g	5	1	20,0
0,04g/ 5g	5	0	0,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato clorofórmico das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,004g/ 5g	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	-	0,0
0,004g/ 5g	5	0	0,0

*Primeira etapa de extração.

ANEXO IX - EXTRATO EM ACETATO DE ETILA

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. grandis* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,03g/ 5g*	5	5	100,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,03g/ 5g	5	0	0,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. grandis* após 30 em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g	5	1	20,0
0,03g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. grandis* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	1	100,0
0,004g/ 5g	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,003g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	1	20,0
0,01g/ 5g*	5	5	100,0
0,03g/ 5g*	5	5	100,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,01g/ 5g	5	4	80,0
0,03g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. urophylla* após 30 em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,03g/ 5g*	5	5	100,0
0,005g/ 5g	5	0	0,0
0,03g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato em acetato de etila das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Chironomus xanthus*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	5	0	0,0
0,005g/ 5g*	5	0	0,0
0,01g/ 5g*	5	0	0,0
0,003g/ 5g	5	5	100,0
0,005g/ 5g*	5	0	100,0
0,01g/ 5g*	5	1	20,0
0,003g/ 5g	5	5	100,0

*Primeira etapa de extração.

ANEXO X - EXTRATO ETANOLICO

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
EG 40 μL .100 mL^{-1} *	7,40	167,4	6,18	28,79
EG 80 μL .100 mL^{-1}	7,37	169,5	6,11	-
EG 160 μL .100 mL^{-1}	7,56	175,9	6,20	-
EG 40 μL .100 mL^{-1}	7,98	183,4	6,31	28,79
EG 80 μL .100 mL^{-1}	8,02	183,5	6,25	-
EG 160 μL .100 mL^{-1}	8,10	185,1	6,17	53,62

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. grandis* (serapilheira) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	8,03	182,0	6,44	36,72
EG 50 μL .100 mL^{-1} *	8,34	184,8	6,46	49,30
EG 70 μL .100 mL^{-1} *	8,28	192,1	6,34	-
EG 120 μL .100 mL^{-1} *	8,26	189,0	6,24	-
EG 250 μL .100 mL^{-1} *	8,27	191,8	6,20	53,65
EG 30 μL .100 mL^{-1}	7,32	169,5	6,21	48,65
EG 70 μL .100 mL^{-1}	7,21	169,8	6,25	-
EG 120 μL .100 mL^{-1}	7,18	170,3	6,20	-
EG 250 μL .100 mL^{-1}	7,12	170,4	6,26	54,63

*Etapas de extração

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
EG 50 μL .100 mL^{-1} *	7,97	187,0	6,36	32,86
EG 100 μL .100 mL^{-1} *	8,01	184,1	6,25	-
EG 150 μL .100 mL^{-1} *	8,01	184,5	6,15	-
EG 200 μL .100 mL^{-1} *	7,89	182,3	6,37	49,30
EG 250 μL .100 mL^{-1}	8,07	186,1	6,35	53,04
EG 50 μL .100 mL^{-1}	7,50	140,7	6,56	-
EG 100 μL .100 mL^{-1}	7,29	166,1	6,59	-
EG 150 μL .100 mL^{-1}	7,23	171,7	6,26	-
EG 200 μL .100 mL^{-1}	7,00	170,1	6,44	-
EG 250 μL .100 mL^{-1}	7,30	170,3	6,61	57,51

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
EU 30 μL .100 mL^{-1}	8,27	194,8	6,43	38,62
EU 100 μL .100 mL^{-1}	8,35	193,1	6,38	-
EU 300 μL .100 mL^{-1}	8,22	192,8	6,31	43,25

Tabela 5 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
EU 15 μL .100 mL^{-1}	7,89	190,8	6,37	36,97
EU 45 μL .100 mL^{-1}	7,83	188,1	6,36	-
EU 75 μL .100 mL^{-1}	8,03	192,0	6,10	49,25

Tabela 6 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos etanólicos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros *D. similis* e *D. laevis*.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCo}_3$)
EG 50 μL .100 mL^{-1}	8,30	194,5	6,38	49,25
EG 150 μL .100 mL^{-1}	8,36	193,2	6,42	-
EG 300 μL .100 mL^{-1}	8,32	168,6	6,48	-

ANEXO XI- EXTRATO ETANÓLICO

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
75µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0
150µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0
250µL.100mL ⁻¹	13	13	100,0
75µL.100mL ⁻¹	16	15	93,7
150µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0
250µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
100µL.100mL ⁻¹	14	13	92,8
200µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0
300µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
150µL.100mL ⁻¹ *	12	5	41,6
250µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
400µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
150µL.100mL ⁻¹	12	5	41,6
250µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
400µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla da serapilheira* da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
75µL.100mL ^{-1*}	12	4	33,3
150µL.100mL ⁻¹	12	11	91,6
250µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
75µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
150µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0
250µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* da serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
40µL.100mL ^{-1*}	16	1	6,2
80µL.100mL ^{-1*}	16	7	43,7
160µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
30µL.100mL ⁻¹	16	0	0
70µL.100mL ⁻¹	16	7	43,7
120µL.100mL ⁻¹	16	12	75,0
250µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

Tabela 7 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
100µL.100mL ⁻¹	12	4	33,3
200µL.100mL ⁻¹	12	11	91,6
300µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 8 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	0	0	0
100 μ L.100mL ⁻¹	12	2	16,6
200 μ L.100mL ⁻¹	12	6	50,0
300 μ L.100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 9 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
150 μ L.100mL ⁻¹	16	15	93,7
250 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0
400 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0
150 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0
250 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0
400 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 10 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
15 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
45 μ L.100mL ⁻¹	16	7	43,7
75 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0
15 μ L.100mL ⁻¹	16	0	0
45 μ L.100mL ⁻¹	16	7	43,7
75 μ L.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 11 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	0	0	0
50µL.100mL ⁻¹ *	16	0	0
100µL.100mL ⁻¹	16	5	31,2
200µL.100mL ⁻¹ *	16	16	100,0
50µL.100mL ⁻¹	16	0	0
100µL.100mL ⁻¹	16	5	31,2
200µL.100mL ⁻¹	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 12 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	0	0	0
50µL. 100mL ⁻¹	12	0	0
150µL100mL ⁻¹	12	5	41,6
250µL.100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 13 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	0	0	0
50µL.100mL ⁻¹	12	0	0
150µL. 100mL ⁻¹	12	5	41,6
250µL. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 14 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* 30 dias após contato com a lagoa Ferruginha da primeira etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0
30µL. 100mL ⁻¹	16	0	0
100µL100mL ⁻¹	16	7	33,3
200µL. 100mL ⁻¹	16	16	100,0

Tabela 15 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* 30 dias após contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
50 μ L.100mL ⁻¹	12	0	0
100 μ L.100mL ⁻¹	12	4	33,3
250 μ L.100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 16 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
30 μ L.100mL ⁻¹	12	0	0
100 μ L.100mL ⁻¹	12	4	33,3
200 μ L.100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 17 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	20	0	0
30 μ L.100mL ⁻¹	20	0	0
100 μ L.100mL ⁻¹	20	7	35,0
200 μ L.100mL ⁻¹	20	20	100,0

Tabela 18 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0
25 μ L. 100mL ⁻¹	12	0	0
50 μ L. 100mL ⁻¹	12	5	41,6
100 μ L. 100mL ⁻¹	12	12	100,0
25 μ L. 100mL ⁻¹	12	0	0
50 μ L. 100mL ⁻¹	12	4	33,3
100 μ L. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 19 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis** e *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0,0
50µL. 100mL ⁻¹	16	0	0,0
150µL. 100mL ⁻¹	16	5	31,2
300µL. 100mL ⁻¹	16	16	100,0
50µL. 100mL ⁻¹	12	0	0,0
150µL. 100mL ⁻¹	12	3	25,0
300µL. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 20 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0,0
50µL. 100mL ⁻¹	16	0	0,0
125µL. 100mL ⁻¹	16	7	58,3
200µL. 100mL ⁻¹	16	16	100,0

Obs. Não tem extrato da primeira etapa.

Tabela 21 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
50µL. 100mL ⁻¹	12	0	0,0
125µL. 100mL ⁻¹	12	5	41,6
200µL. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

Tabela 22 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
50µL. 100mL ⁻¹	12	0	0,0
150µL. 100mL ⁻¹	12	6	50,0
300µL. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

Obs. Não tem extrato da primeira etapa.

Tabela 23 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
50 μ L. 100mL ⁻¹	12	0	0,0
150 μ L. 100mL ⁻¹	12	6	50,0
300 μ L. 100mL ⁻¹	12	12	100,0

Obs. Não tem extrato da primeira etapa.

Tabela 24 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato etanólico das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	20	0	0,0
50 μ L. 100mL ⁻¹	20	0	0,0
150 μ L. 100mL ⁻¹	20	4	20,0
300 μ L. 100mL ⁻¹	20	20	100,0

Obs. Não tem extrato da primeira etapa.

ANEXO XII - EXTRATO AQUOSO

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* da serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	8,03	163,40	6,25	36,72
EG 300 μL .100mL ⁻¹	8,22	191,10	6,53	48,36
EG 600 μL .100mL ⁻¹	8,29	192,00	6,49	37,65
EG 1200 μL .100mL ⁻¹	8,29	193,10	6,45	55,23
EU 300 μL .100mL ⁻¹	8,30	184,60	6,41	44,52
EU 600 μL .100mL ⁻¹	8,31	184,90	6,35	49,65
EU 1200 μL .100mL ⁻¹	8,28	186,10	6,33	45,30

Tabela 2 – parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 30 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	8,03	163,40	6,25	36,72
EG 200 μL .100mL ⁻¹	8,20	187,7	6,31	49,29
EG 500 μL .100mL ⁻¹	8,28	174,2	6,23	38,96
EG 1000 μL .100mL ⁻¹	8,30	184,7	6,42	51,15
EU 200 μL .100mL ⁻¹	8,20	187,7	6,31	46,59
EU 500 μL .100mL ⁻¹	8,28	174,2	6,23	48,63
EU 1000 μL .100mL ⁻¹	8,30	184,7	6,42	52,36

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 60 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	8,03	163,4	6,25	36,72
EG 300 μL .100mL ⁻¹	8,25	189,9	6,46	49,29
EG 700 μL .100mL ⁻¹	8,32	189,0	6,34	38,96
EG 1500 μL .100mL ⁻¹	8,32	186,0	6,30	51,15
EU 300 μL .100mL ⁻¹	8,25	189,2	6,49	46,59
EU 700 μL .100mL ⁻¹	8,31	188,3	6,42	48,63
EU 1500 μL .100mL ⁻¹	8,30	189,6	6,35	52,36

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 60 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
EG 2500 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,23	189,7	6,02	48,30
EG 5000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,19	195,1	6,01	17,62
EG 10000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,04	215,0	5,79	55,62
EU 2500 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,25	188,8	6,18	39,54
EU 5000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,24	191,7	6,17	36,54
EU 10000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,15	198,4	5,91	53,32

Não tinha 60 dias da 2ª etapa de *E. urophylla*

Tabela 5 – Parâmetros físicos e químicos (iniciais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
EG 2500 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,14	196,0	5,96	36,95
EG 5000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,08	203,0	5,98	-
EG 10000 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	8,04	209,0	5,81	51,17

Não tinha 60 dias da 2ª etapa de *E. urophylla*

Tabela 6 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* serapilheira da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
controle	7,54	170,8	6,66	36,72
EG 300 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$ *	7,45	178,3	6,33	45,12
EG 600 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$ *	7,46	176,8	6,27	-
EG 1200 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$ *	7,40	175,8	6,29	49,23
EU 300 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	7,41	178,3	6,29	36,72
EU 600 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	7,42	178,3	6,23	-
EU 1200 $\mu\text{L}.100\text{mL}^{-1}$	7,42	179,4	6,30	49,25

Tabela 7 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 30 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,20	169,8	6,42	38,20
EG 300 μL .100mL ^{-1*}	7,42	175,1	6,38	42,65
EG 700 μL .100mL ^{-1*}	7,40	175,2	6,41	-
EG 1500 μL .100mL ^{-1*}	7,40	180,2	6,35	50,36
EU 300 μL .100mL ⁻¹	7,46	174,7	6,31	-
EU 700 μL .100mL ⁻¹	7,44	176,4	6,29	45,32
EU 1500 μL .100mL ⁻¹	7,40	177,3	6,26	51,64

Tabela 8 – Parâmetros físicos e químicos (finais) dos extratos aquosos das folhas de *E. grandis* e *E. urophylla* após 60 dias em contato com as lagoas (Palmeirinha e Ferruginha) da primeira e da segunda etapa de extração utilizados nos testes com cladóceros.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD* (mg L^{-1})	Dureza ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)
Controle	7,54	170,8	6,66	41,20
EG 2500 μL .100mL ^{-1*}	7,56	184,6	6,24	48,36
EG 5000 μL .100mL ^{-1*}	7,49	164,6	6,37	-
EG 10000 μL .100mL ^{-1*}	7,50	208,1	6,39	53,26
EU 2500 μL .100mL ⁻¹	7,44	208,1	6,30	57,51
EU 5000 μL .100mL ⁻¹	7,40	189,9	6,35	-
EU 10000 μL .100mL ⁻¹	7,45	201,3	6,23	61,25

ANEXO XIII - EXTRATO AQUOSO

Tabela 1 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	20	0	0,0
10µL.100mL ^{-1*} .	20	0	0,0
40µL.100mL ^{-1*} .	20	1	5,0
70µL.100mL ^{-1*} .	20	2	10,0
1200µL.100mL ^{-1*} .	20	5	25,0

Tabela 2 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0,0
300µL.100mL ^{-1*} .	14	0	0,0
750µL.100mL ^{-1*} .	14	2	14,3
1500µL.100mL ^{-1*} .	14	14	100,0

Tabela 3 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0,0
150µL.100mL ^{-1*} .	14	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	14	3	21,4
750µL.100mL ^{-1*} .	14	4	28,6

Tabela 4 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	20	0	0,0
75µL.100mL ^{-1*} .	20	0	0,0
300µL.100mL ^{-1*} .	20	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	20	5	25,0
750µL.100mL ^{-1*} .	20	4	20,0

Tabela 5 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
200µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	12	3	25,0
1000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0
200µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	12	4	33,3
1000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 6 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0,0
200µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	2	12,5
1000µL.100mL ^{-1*} .	16	16	100,0
200µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	2	12,5
1000µL.100mL ^{-1*} .	16	16	100,0

*Primeira etapa de extração.

Tabela 7 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
3000µL.100mL ^{-1*} .	12	2	16,6
500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	12	2	16,6
3000µL.100mL ^{-1*} .	12	1	8,3

*Primeira etapa de extração.

Tabela 8 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
500 μ L.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
1500 μ L.100mL ^{-1*} .	12	3	25,0
3000 μ L.100mL ^{-1*} .	12	4	33,3
500 μ L.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
1500 μ L.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
3000 μ L.100mL ^{-1*} .	12	2	16,6

*Primeira etapa de extração.

Tabela 9 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
100 μ L.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
500 μ L.100mL ^{-1*} .	13	4	30,7
900 μ L.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

Tabela 10 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
100 μ L.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500 μ L.100mL ^{-1*} .	17	4	23,6
900 μ L.100mL ^{-1*} .	17	12	70,6

Tabela 11 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
100 μ L.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500 μ L.100mL ^{-1*} .	17	4	25,0
900 μ L.100mL ^{-1*} .	17	12	70,6

Tabela 12 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
300µL.100mL ^{-1*} .	14	0	0,0
600µL.100mL ^{-1*} .	14	3	21,4
1200µL.100mL ^{-1*} .	14	14	100,0

Tabela 13 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E.* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
3000µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	12	4	33,3
3000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

**Daphnia similis*.

Tabela 14 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	10	0	0,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	12	1	8,3
10000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	12	1	8,3
10000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

*Primeira etapa.

Tabela 15 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. grandis* após 60 dias em contato com a lagoa Palmeirinha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
10000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	13	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
10000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

*Primeira etapa.

Tabela 16 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
100µL.100mL ^{-1*} .	12	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	12	6	50,0
900µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

Tabela 17 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
100µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	7	43,7
900µL.100mL ^{-1*} .	16	9	56,2

Tabela 18 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* das folhas de serapilheira da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
300µL.100mL ^{-1*} .	11	0	0,0
600µL.100mL ^{-1*} .	14	6	42,8
1200µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

Tabela 19 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	12	0	0,0
300µL.100mL ^{-1*} .	13	0	0,0
700µL.100mL ^{-1*} .	14	5	35,7
1500µL.100mL ^{-1*} .	14	14	100,0

Tabela 20 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis* e *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
3000µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
1500µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0
3000µL.100mL ^{-1*} .	16	0	0,0

**Daphnia similis*.

Tabela 21 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* pós 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia similis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	10	0	0,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	11	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	12	4	33,3
10000µL.100mL ^{-1*} .	11	11	100,0
2500µL.100mL ^{-1*} .	10	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1*} .	11	3	27,3
10000µL.100mL ^{-1*} .	12	12	100,0

*Primeira etapa.

Tabela 22 – Controle dos testes ecotoxicológicos com extrato aquoso das folhas de *E. urophylla* após 60 dias em contato com a lagoa Ferruginha da primeira e da segunda etapa de extração utilizando *Daphnia laevis*.

Amostra	Número de organismos	Organismos imóveis	Imobilidade (%)
Controle	14	0	0,0
2500µL.100mL ⁻¹ *	13	0	0,0
5000µL.100mL ^{-1**}	12	1	8,3
10000µL.100mL ⁻¹ *	12	12	100,0
2500µL.100mL ⁻¹ *	13	0	0,0
5000µL.100mL ⁻¹ *	14	2	14,3
10000µl.100mL ⁻¹ *	12	12	100,0

*Primeira etapa.

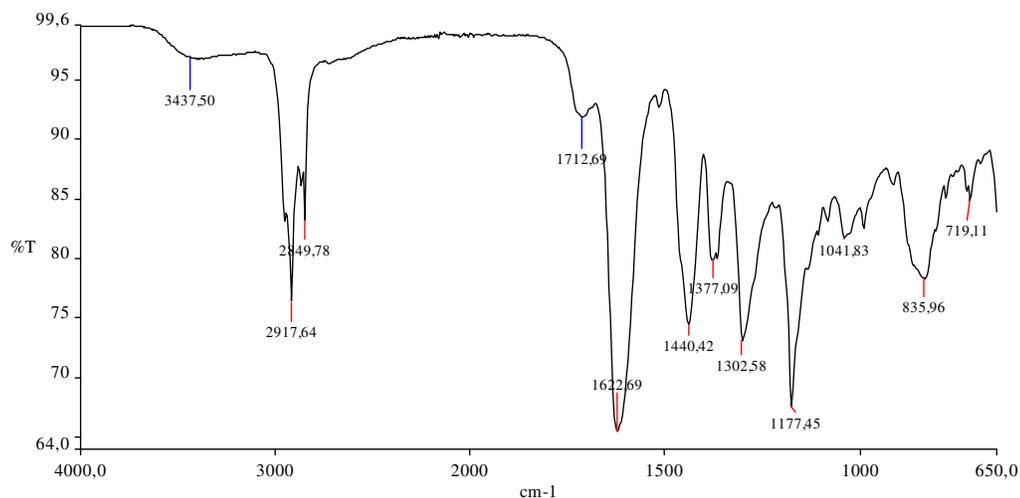
ANEXO XIV – ESPECTROSCOPIA EM INFRAVERMELHO

Figura 1 – Espectro no IV do extrato hexânico das folhas de *E. grandis*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha (primeira decomposição).

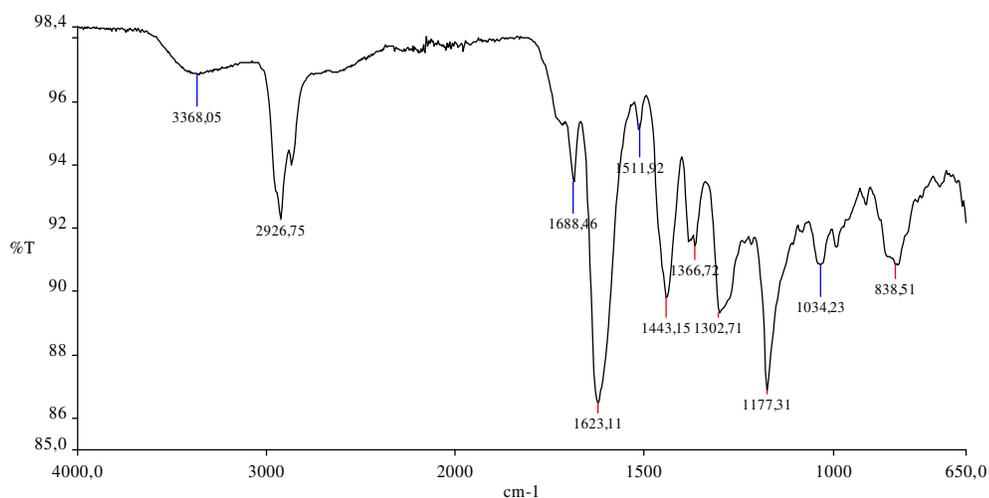


Figura 2 – Espectro no IV do extrato clorofórmico das folhas de *E. grandis* após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha (primeira decomposição).

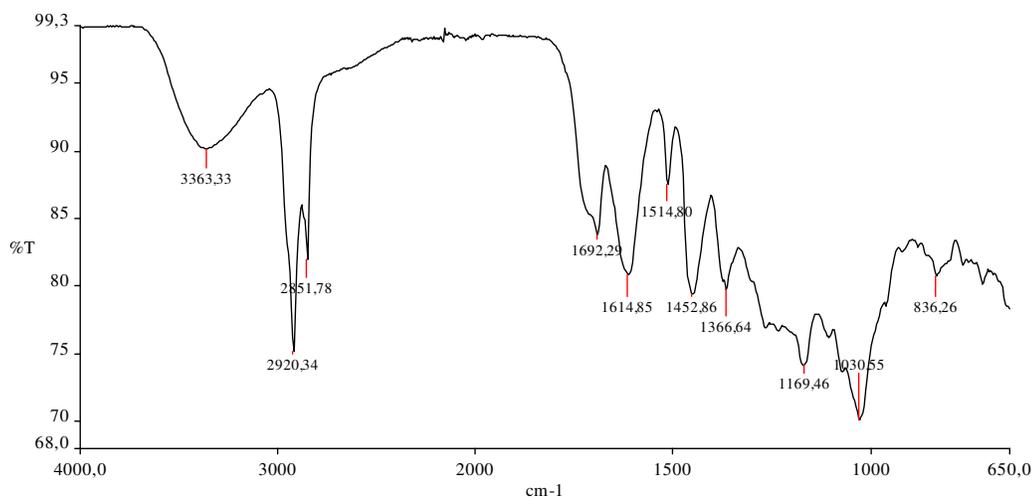


Figura 3 – Espectro no IV do extrato em acetato de etila das folhas de *E. grandis*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha (primeira decomposição).

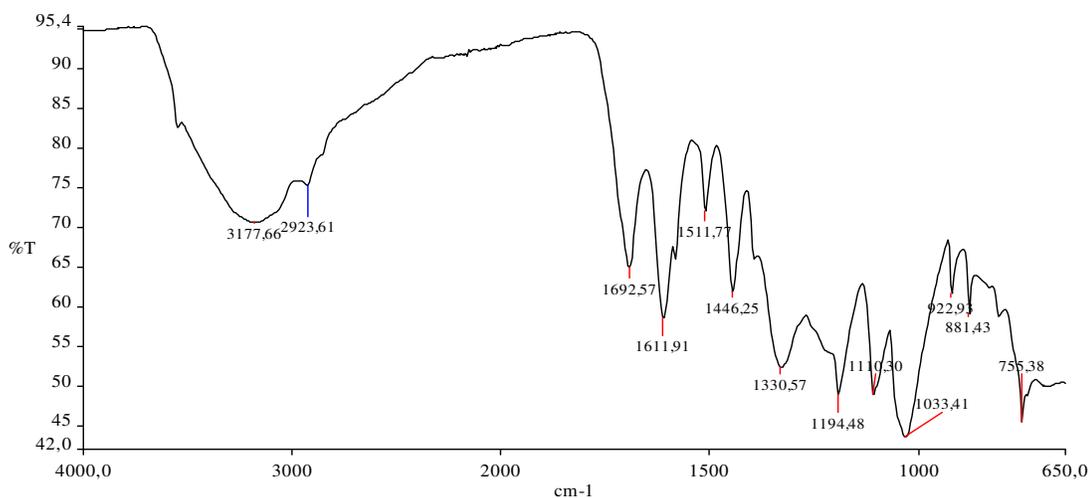


Figura 4 – Espectro no IV do extrato etanólico das folhas de *E. grandis*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha (primeira decomposição).

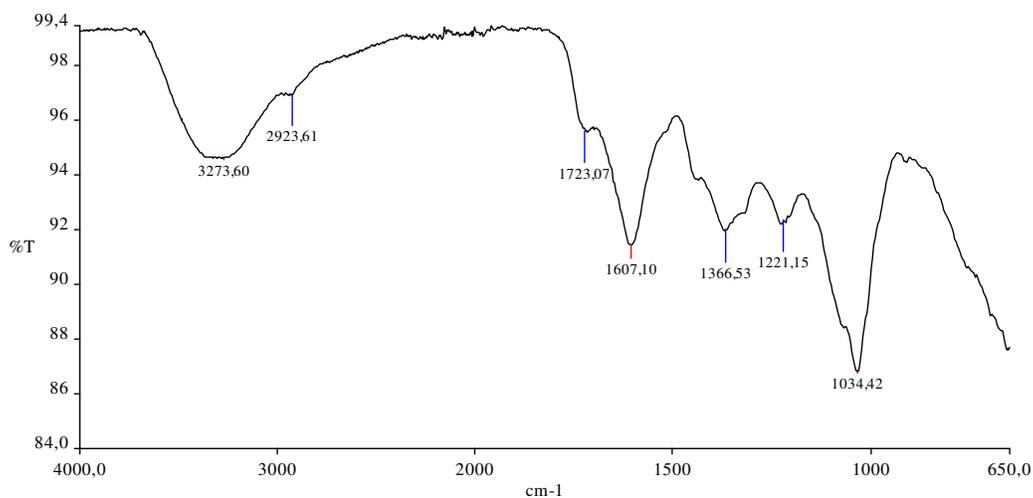


Figura 5 – Espectro no IV do extrato aquoso das folhas de *E. grandis*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Palmeirinha (primeira decomposição).

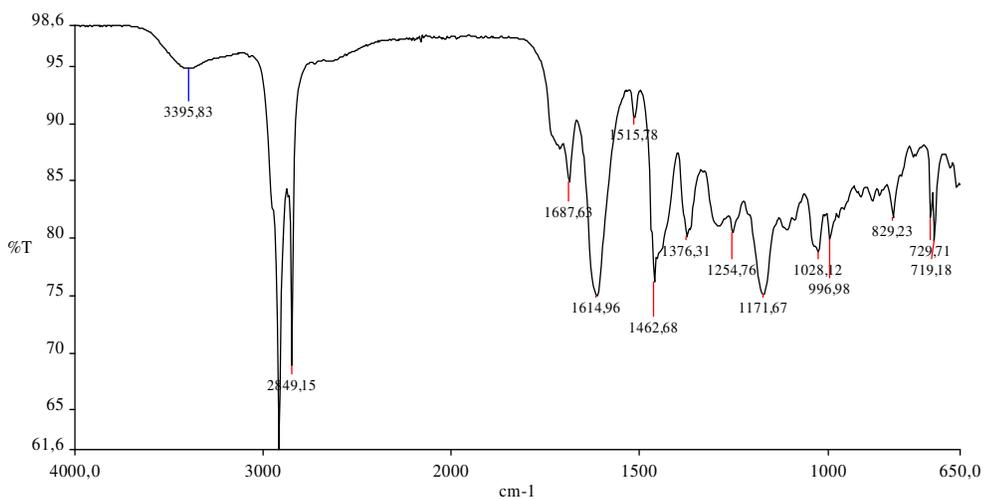


Figura 6 – Espectro no IV do extrato hexânico das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha (primeira decomposição).

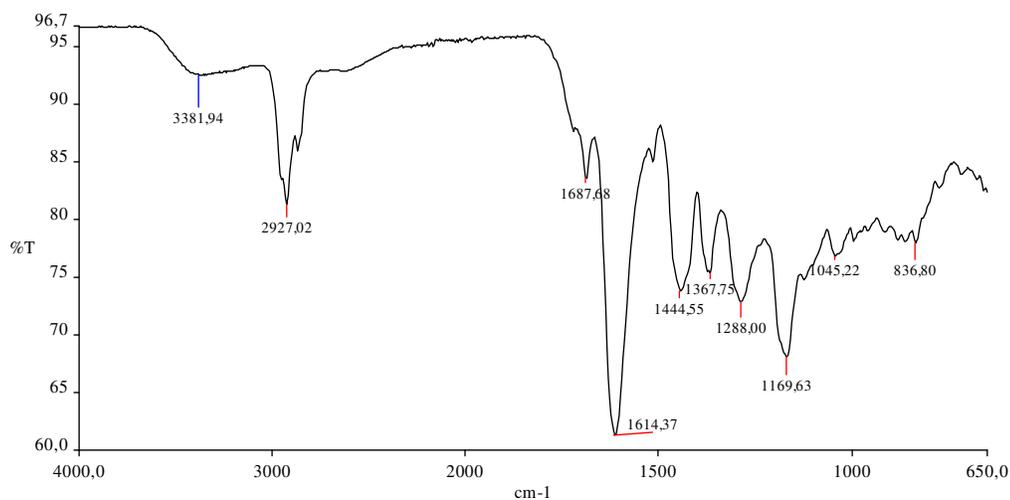


Figura 7 – Espectro no IV do extrato clorofórmico das folhas de *E. urophylla*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha (primeira decomposição).

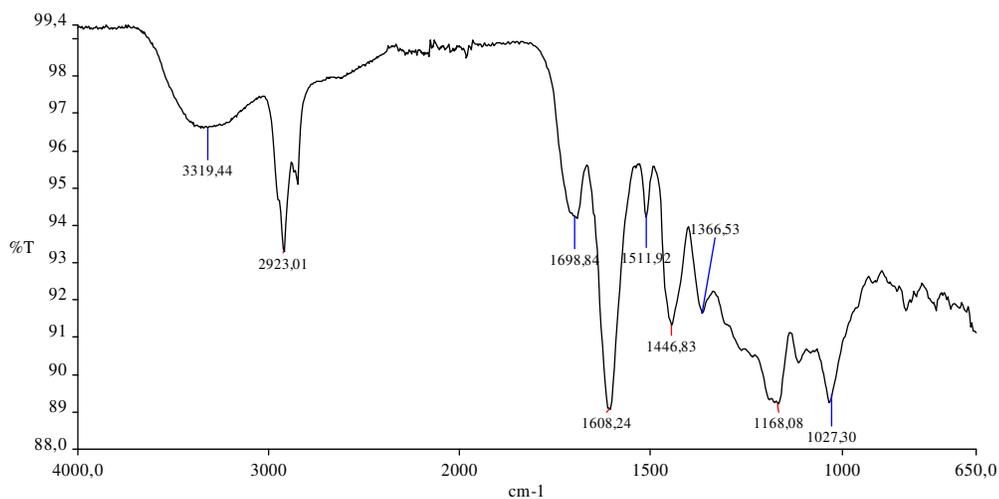


Figura 8 – Espectro no IV do extrato acetato de etila das folhas de *E. urophylla* após 30 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha (primeira decomposição).

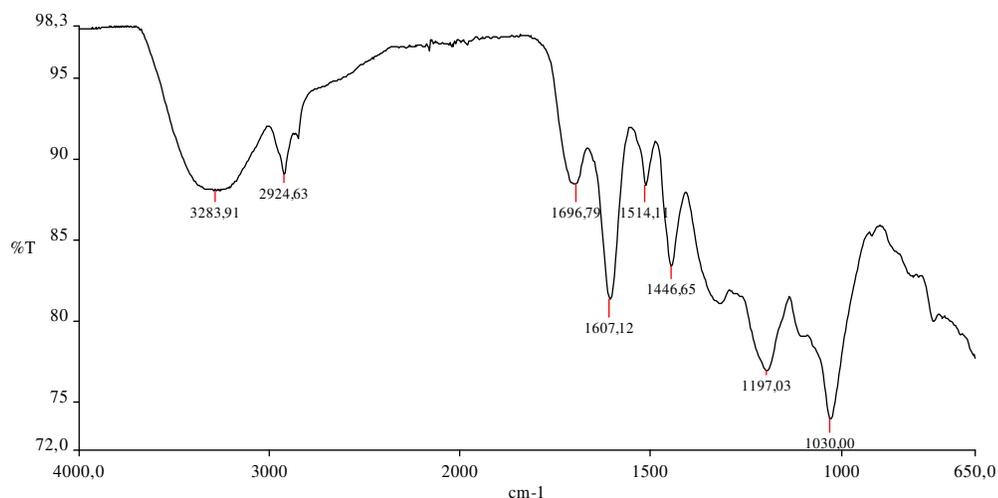


Figura 9 – Espectro no IV do extrato etanólico das folhas de *E. urophylla*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha (primeira decomposição).

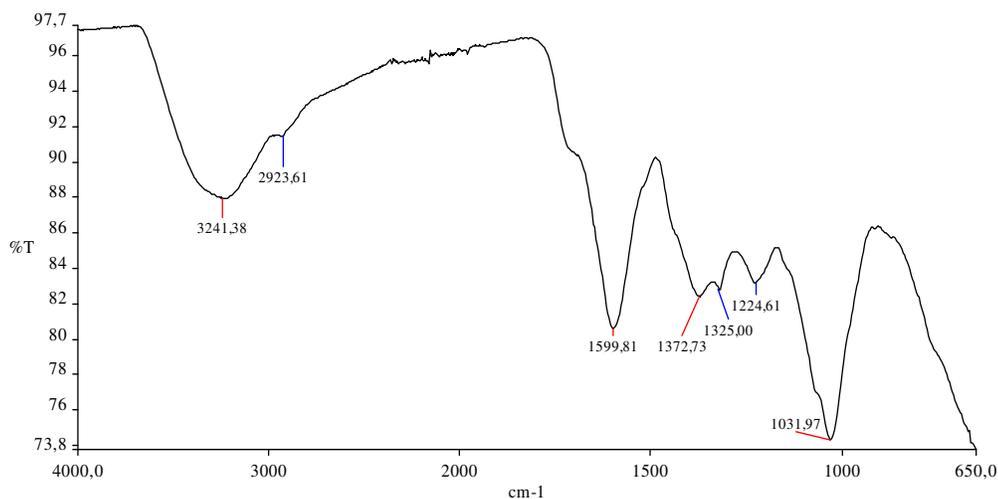


Figura 10 – Espectro no IV do extrato aquoso das folhas de *E. urophylla*, após 30 dias em contato com as águas da lagoa Ferruginha (primeira decomposição).