

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**MARIA GABRIELA MARQUES DE SOUZA**

**POTENCIAL ALELOPÁTICO E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO  
HÍBRIDO *Eucalyptus urograndis***

VITÓRIA - ES

Março de 2020

MARIA GABRIELA MARQUES DE SOUZA

**POTENCIAL ALELOPÁTICO E COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO  
HÍBRIDO *Eucalyptus urograndis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hildegardo Seibert França

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Viviana Borges Corte

VITÓRIA - ES,

Março de 2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

M357p Marques de Souza, Maria Gabriela, 1992-  
Potencial alelopático e composição fitoquímica do híbrido  
Eucalyptus urograndis / Maria Gabriela Marques de Souza. -  
2020.  
76 f. : il.

Orientador: Hildegardo Seibert França.  
Coorientadora: Viviana Borges Corte.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. E. urophylla x E. grandis. 2. Aleloquímicos. 3. Cedro rosa.  
4. Extratos foliares. 5. Fitotoxicidade. I. Seibert França,  
Hildegardo. II. Borges Corte, Viviana. III. Universidade Federal  
do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV.  
Título.

CDU: 57

---

Maria Gabriela Marques de Souza

**“Potencial alelopático e composição fitoquímica do híbrido  
*Eucalyptus urograndis*”**

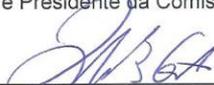
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 05 de março de 2020.

Comissão Examinadora:



**Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (UFES)**  
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora



**Profa. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)**  
Coorientadora



**Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)**  
Examinadora Titular interna



**Profa. Dra. Janaina Brandão Seibert (UFOP)**  
Examinadora Titular Externa

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Espírito Santo;

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal;

À agência de fomento à pesquisa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que subsidiou a bolsa para a realização do projeto e pesquisa;

Ao IFES – Campus Vila Velha e Campus Santa Tereza, por todo suporte técnico;

A Fibria por permitir a coleta das folhas de Eucalyptus para a preparação dos extratos.

Ao LabPetro pela realização das análises de cromatografia gasoso, em especial Poliana;

Ao meu orientador Hildegardo Seibert França, por compartilhar seu conhecimento e me direcionar na execução do projeto;

A Viviana Borges Corte, por abrir as portas do LASEF para que pudesse realizar os experimentos e pela orientação, conversas e sugestões;

Aos meus amigos do LASEF, em especial Josinei, Camila e Rodolfo, por toda ajuda e companheirismo;

A minha amiga Juliana Trindade, por toda ajuda, apoio, conversas, risadas e desabafos.

A Yasmin por toda ajuda com a análise estatística.

Aos demais amigos de PPGBV que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se realizasse.

A minha mãe, padrasto e irmãos. Especialmente Carol, minha irmã, por sempre estar comigo.

Aos meus avós, tias e primas. A Maria e meus cunhados por estarem me acompanhando e incentivando na minha trajetória acadêmica.

Agradeço imensamente a minha família, meu companheiro Bartolomeu por todo apoio, paciência e carinho e minha filha Mayá Ybotyra, por me dar ânimo para seguir em frente. Amo vocês.

A todos muito obrigada.

## RESUMO

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. possui um elevado interesse econômico, por sua versatilidade de usos e valor da madeira. O híbrido *Eucalyptus urograndis* (*E. urophylla* S.T. Blakee x *E. grandis* Hill ex Maiden.) é amplamente utilizado no Brasil. Apesar de sua elevada importância econômica, estudos direcionados a atividade alelopática e seu impacto sobre a vegetação nativa são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de extratos etanólicos e suas frações, obtidos de folhas maduras e da serrapilheira de *Eucalyptus urograndis* clone PL3335, sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. e *Cedrela fissilis* Vell., assim como a caracterização química. Folhas maduras e da serrapilheira foram coletadas, secas e submetidas a extração por maceração com etanol seguido pelo fracionamento com hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEtOH), butanol (BuOH) e aquosa (Aq). Para testar o potencial alelopático dos extratos e frações foi realizado um bioensaio de germinação com as concentrações de 0; 1,25; 2,5; 5 e 10mg/mL, utilizando as sementes de *L. sativa* e *C. fissilis*. O experimento foi conduzido por 7 dias e 21 dias, respectivamente, avaliando diariamente a germinação. Os parâmetros analisados foram porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) e crescimento inicial (comprimento, massa fresca e seca da parte aérea e radícula). Foram realizadas análises químicas por cromatografia afim de verificar a presença de substâncias do metabolismo secundário. Apenas os extratos brutos, as frações Hex e DCM afetaram negativamente %G da *Lactuca sativa*, as demais frações tiveram influência no crescimento inicial. Todos os extratos e frações provocaram redução na %G e crescimento inicial de *C. fissilis*. A fração DCM destaca-se por afetar todas as variáveis analisadas, para ambas espécies receptoras, de forma mais pronunciada. Nas análises pela cromatografia em camada delgada (CCD) foram identificadas a presença dos grupos de alcaloides, derivados de antra-cenos, cumarinas, lignanas, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteróides e compostos fenólicos. Pela cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) foi possível identificar eucaliptol,  $\alpha$ -terpineol (encontrado nos extratos brutos e frações Hex e DCM), cariofileno, espatulenol e sistosterol, com prováveis componentes ativos. A atividade das frações DCM, deve-se em parte a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos com potencial alelopático já conhecido. Dado o efeito negativo sobre a %G e crescimento inicial, a fração DCM tem potencial para utilização como bioerbicida. Os resultados mostraram que o híbrido pode ter impacto sobre a vegetação nativa e cultivada,

não sendo indicada a utilização de *E. urograndis* em consorcio com cedro rosa. A sua adoção em sistemas agroflorestais depende da espécie cultivada selecionada e necessita de mais investigação.

**Palavras-chave:** aleloquímicos • cedro rosa • extratos foliares • eucalipto • fitotoxicidade

## ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* L'Hér. has a high economic interest, due to versatility of uses and value of wood. The hybrid *Eucalyptus urograndis* (*E. urophylla* S.T. Bla-kee x *E. grandis* Hill ex Maiden.) is widely used in Brazil. Despite the high economic importance, studies in allelopathic activity and impact on native vegetation are scarce. The goal of this work was to evaluate the allelopathic potential of ethanol extracts and their fractions from mature leaves and litter of *Eucalyptus urograndis* clone PL3335 on the germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. and *Cedrela fissilis* Vell., as well as chemical composition evaluation. Ripe and litter leaves were collected, dried and extracted with ethanol following by fractionation with hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AcEtOH), butane (BuOH) and aqueous (Aq). The allelopathic potential test of the extracts and fractions was performed a germination bioassay with solutions samples in concentrations of 0; 1.25; 2.5; 5 and 10mg/mL, using the seeds of *L. sativa* and *C. fissilis*. The experiment was carried out for 7 days and 21 days, respectively, evaluating germination daily. The parameters analyzed were germination percentage (% G), germination speed index (IVG) and initial growth (length, fresh and dry mass of the aerial part and root). Chemical analyzes were performed by chromatography to verify the presence of substances from the secondary metabolism. Only the crude extracts, the Hex and DCM fractions negatively affected the %G of *Lactuca sativa*, the other fractions have an influence on the initial growth. All extracts and fractions caused a reduction in % G and initial growth of *C. fissilis*. The DCM fraction stands out for affecting all the variables analyzed, for both recipient species, in a more pronounced way. In the analysis by thin layer chromatography (TLC), the presence of groups of alkaloids, anthracenes derived, coumarins, lignans, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, steroids and phenolic compounds were identified. By gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) it was possible to identify eucalyptol,  $\alpha$  – terpineol (found in the crude extracts and fractions Hex and DCM), caryophyllene, spathulenol and sistosterol, with probable active components. The activity of the DCM fraction is due in part to the presence of monoterpenes, sesquiterpenes and triterpenes with known allelopathic potential. Given the negative effect on %G and initial growth, the DCM fraction has the potential to be used as a bioherbicide. The results showed that the hybrid can have an impact on native and cultivated vegetation, and the use of *E. urograndis* in intercropping with cedar rose is not indicated. Its adoption in agroforestry systems depends on the cultivated species selected and needs further investigation.

**Keywords:** allelochemicals • cedar rose • eucalyptus • leaf extracts • phytotoxicity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de liberação de aleloquímicos no ambiente (adaptado de ALBUQUERQUE et al., 2011).....	19
Figura 2 – Local de coleta, no município de Aracruz – ES. Abaixo interior da plantação clonal de <i>E. urograndis</i> , �rea 27 – Talhão 5. ....	38
Figura 3 - Esquema de fracionamento dos extratos etanólicos de folhas maduras e serrapilheira de <i>Eucalyptus urograndis</i> (Adaptado de TANVEER et al., 2012). ....	39
Figura 4 - Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas maduras (A) e serrapilheiras (B); extratos hexânicos das folhas maduras (C) e serrapilheiras (D); extratos diclometano das folhas maduras (E) e serrapilheiras (F) .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cromatografia em camada delgada (CCD), sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos fitoquímicos. ....	42
Tabela 2 - Rendimento da extração com etanol das folhas maduras e da serrapilheira de <i>Eucalyptus urograndis</i> . ....	44
Tabela 3 – Rendimento do fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas maduras e da serrapilheira de <i>Eucalyptus urograndis</i> . Seguindo a ordem crescente de polaridade. ....	45
Tabela 4 – Porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de <i>Lactuca sativa</i> , submetida a extratos etanólicos e suas frações de <i>Eucalyptus urograndis</i> . ....	46
Tabela 5 – Porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de <i>Cedrela fissilis</i> , submetida a extratos etanólicos e suas frações de <i>Eucalyptus urograndis</i> . ....	48
Tabela 6 – Crescimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> . Comprimento da parte aérea (CPA) e da radícula (CR) em cm/plântula, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da radícula (MFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) e da radícula (MSR) em mg/plântula. ....	50
Tabela 7 – Crescimento inicial de <i>Cedrela fissilis</i> . Comprimento da parte aérea (CPA) e da radícula (CR) em cm/plântula, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da radícula (MFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) e da radícula (MSR) em mg/plântula. ....	52
Tabela 8 – pH e Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) dos extratos e frações de folhas maduras e serrapilheira de <i>Eucalyptus urograndis</i> , nas diferentes concentrações (mg/mL) testadas;. ....	54
Tabela 9 - Germinação e crescimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> em função do pH. ....	55
Tabela 10 - Germinação e crescimento inicial de <i>Cedrela fissilis</i> em função do pH. ....	55
Tabela 11 - Germinação e crescimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> em função do potencial osmótico. ....	56
Tabela 12 - Germinação e crescimento inicial de <i>Cedrela fissilis</i> em função do potencial osmótico. ....	56
Tabela 13 - Identificação dos grupos químicos no extrato bruto e suas frações de folhas maduras e de serrapilheira de <i>E. urograndis</i> pelo método de cromatografia por camada delgada. ....	57
Tabela 14 – Compostos encontrados nos extratos brutos e frações de hexano e diclorometano de folhas maduras e de serrapilheira de <i>Eucalyptus urograndis</i> por meio de Cromatografia gasosa em espectrômetro de massa (CG-EM). ....	60

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AcEtOH – Acetato de etila

Aq - Aquoso

BuOH - Butanol

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia Gasosa em Espectrômetro de Massa

CPA – Comprimento da Parte Aérea

CR – Comprimento da Radícula

DCM - Diclorometano

DMSO - Dimetilsulfóxido

ERO – Espécies reativas de oxigênio

Hex – Hexano

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

MFPA – Massa Fresca da Parte Aérea

MFR – Massa Fresca da Radícula

MPa – Megapascal

MSPA – Massa Seca da Parte Aérea

MSR - Massa Seca da Radícula

OE - Óleo Essencial

%G – Porcentagem de Germinação

## SUMARIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	15
2. OBJETIVO GERAL .....	18
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	19
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS (verificar).....	25
Capítulo 1 - Potencial alelopático e composição fitoquímica dos extratos foliares do híbrido <i>Eucalyptus urograndis</i> clone PL3335 .....	32
1. INTRODUÇÃO .....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
2.1. Espécies estudadas e coleta do material vegetal .....	37
2.2. Local de estudo.....	37
2.3. Preparação dos extratos .....	39
2.4. Bioensaio de germinação .....	40
2.6. Análise fitoquímica .....	42
2.7. Análise estatística.....	44
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Extração e fracionamento .....	44
3.2. Bioensaio germinativo .....	45
3.3. Crescimento inicial .....	49
3.4. pH e Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) .....	54
3.5. Composição fitoquímica das folhas maduras e serrapilheira de <i>E. urograndis</i> ....	56
4. DISCUSSÃO.....	62
5. CONCLUSÃO .....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A alelopatia pode ser definida como “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários gerados por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos” (IAS, 1996). Os compostos secundários estão presentes em todas as plantas, no entanto nem todos esses compostos possuem atividade alelopática (FERREIRA; AQUILA, 2000). As biomoléculas do metabolismo secundário, com efeitos alelopáticos são chamadas aleloquímicos (RICE, 1984; HE et al., 2019).

Os aleloquímicos estão presentes em diversas partes da planta nas mais diferentes concentrações e podem ser liberados dos tecidos vegetais por volatilização, exsudação da raiz, lixiviação e decomposição dos resíduos vegetais (RICE, 1984; ALBUQUERQUE et al., 2011; REIGOSA et al., 2013). Além disso, podem atuar em processos vitais da planta, como divisão celular, crescimento, permeabilidade da plasmalema, fotossíntese, respiração, atividade enzimática, síntese de proteínas e outros (PIRES; OLIVEIRA, 2011; CHENG; CHENG, 2015).

Os metabólitos secundários são responsáveis pelas defesas das plantas e todos esses metabólitos podem ser agrupados quanto a sua natureza química em: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005, TAIZ et al., 2017).

Como muitos desses compostos são capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento de outros indivíduos, eles vêm sendo estudados e utilizados como alternativas naturais a herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas entre outros (ZENG et al., 2010; REIGOSA et al., 2013).

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. – *Myrtaceae*, tem origem na Austrália e outras ilhas da Oceania. São mais de 900 espécies e subespécies reconhecidas botanicamente (BARBOSA et al., 2016). O eucalipto tem grande importância econômica para o Brasil. De acordo com IBÁ (2019), o eucalipto se destaca dentre as espécies que compõe florestas plantadas para fins comerciais e a área destinada a seu plantio no Brasil foi de cerca de 5,7 milhões de hectares em 2018. Ainda, segundo o IBGE (2018), a área de cultivo de eucalipto era de 7,5 milhões de hectares em 2018.

Estas espécies têm propriedades físicas e químicas tão diversas que fazem com que os eucaliptos sejam usados para as mais diversas finalidades como, para produzir celulose e papel, carvão vegetal, sequestro de carbono, geração de energia, extração de óleos essenciais,

utilização na construção civil, movelaria, medicamentos, cosméticos entre outros (SANTAROSA et al., 2014).

Além da sua utilização mais tradicional, o eucalipto vem sendo adotado na composição de sistemas agroflorestais, na qual o eucalipto é cultivado com grãos, gramíneas, arbóreas e gado como uma forma de redução dos impactos que as monoculturas causam (CECCON, 2008).

Além disso, algumas espécies de eucalipto, como *E. grandis* e *E. saligna* vem sendo estudadas para sua utilização auxiliando na regeneração natural, atuando como espécie pioneira, facilitando o crescimento de espécies nativas juvenis (SOUZA et al., 2007; ALENCAR et al., 2011). No entanto, apesar de algumas espécies serem bem sucedidas em tais sistemas, isso não pode ser generalizado, uma vez que as espécies de eucalipto podem apresentar atividade alelopática (YAKUBU et al., 2018) e este ponto deve ser previamente investigado.

A demanda crescente pela madeira e as grandes áreas destinadas as plantações, levantam questões a respeito dos impactos da monocultura de eucalipto para o meio ambiente. Muito se questiona acerca dos efeitos da monocultura sobre o solo (nutrientes e erosão), água (umidade do solo, os aquíferos e lençóis freáticos) e sobre a fauna e flora (VITAL, 2007). Estudos já demonstraram o impacto negativo das plantações nas populações de formigas, levando à homogeneização e redução de sua diversidade (MARTELLO et al., 2018), diminuição dos estoques de carbono no solo (COOK et al., 2016), além de compactação e déficit hídrico no interior da plantação (YANG et al., 2017).

Os principais efeitos observados, relacionados à flora, são a baixa biodiversidade, alteração na composição da flora, quando comparadas a vegetação nativa e regeneração lenta de áreas abandonadas, que podem ser associadas ao potencial alelopático do eucalipto, que seria capaz de afetar o desenvolvimento de outras plantas (EVARISTO et al., 2011; NERI et al., 2005; SOUZA et al., 2013).

Estudos prévios sobre a atividade alelopática de eucalipto, que são em sua maioria realizado por meio de extratos aquosos das folhas e óleos essenciais, demonstraram que várias espécies do gênero continham aleloquímicos com potencial alelopático e inibiam a germinação e crescimento de outras espécies de plantas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; BARBOSA et al., 2016; YAKUBU et al., 2018).

Estudos já evidenciaram a capacidade de redução de germinação e crescimento inicial de outras plantas por extratos foliares aquosos de *E. globulus* (MORSI; ABDELMIGID, 2016; PUIG, 2018), *E. grandis* (ZHANG et al., 2010; SOUZA; CARDOSO, 2013), *E. eythrocorys* (GHNAYA et al., 2015), *E. camaldulensis* (GHANUNI et al., 2015) entre outras espécies de eucalipto. De maneira semelhante, o óleo essencial de *E. salubris*, *E. dundasii*, *E. brockwayii*, *E. spathulata* (ZHANG et al.; 2012), *E. globulus* (JAIME; FERRER, 2018) e *E. citriodora* (BENCHAA et al., 2018), também já provou ter efeitos alelopáticos sobre outras espécies. Em estudos anteriores, foi verificado que o solo de plantações também apresentam atividade alelopática, como os solos de *E. grandis* e *E. urophylla* e isso se deve ao fato de muitos aleloquímicos liberados pelas plantas irem para o solo (ESPINOSA-GARCIA et al., 2008; CHU et al., 2014; SONG et al., 2019).

Alguns destes trabalhos inclusive destacam a possibilidade de algumas dessas espécies serem utilizadas como bioerbicidas, como o *E. globulus* e *E. citriodora* (MORSI; ABDELMIGID, 2016; PUIG, 2018; BENCHAA et al., 2018; JAIME; FERRER, 2018).

O *Eucalyptus urograndis*, é um híbrido resultante do cruzamento de *E. urophylla* S.T. Blakee e *E. grandis* Hill ex Maiden., originado inicialmente de maneira natural e posteriormente clonado, por sua alta produtividade, qualidade de madeira e resistência a seca e ao cancro do eucalipto, causado por *Cryphonectria cubensis*. (SANTAROSA et al., 2014). No Brasil, atualmente, é um dos mais plantados comercialmente, estando presente em vários estados e em outros países (SANTAROSA et al., 2014).

Sabe-se que o *E. urograndis* apresenta atividade alelopática (ESPINOSA-GARCÍA et al., 2008; CARVALLHO et al., 2015; SOUZA et al., 2018), no entanto, estudos sobre o híbrido são escassos, tanto em relação aos seus possíveis efeitos negativos em espécies nativas e cultivadas, quanto sua composição química.

Atualmente tem se intensificado o interesse de produtores rurais e a importância de implantação de sistemas de produção integrado e agroflorestais em suas propriedades e a alelopatia é um ponto a se pensar quando se adota o eucalipto como um dos componentes destes sistemas (CARVALHO et al., 2014; MORAES et al., 2011). O *E. urograndis* poderia ser indicada para essa finalidade, dada a importância econômica e propriedades da madeira.

Nesse sentido entender como o híbrido influencia as espécies cultivadas é de suma importância para se implantar um sistema agroflorestal, silvipastoril ou consórcio utilizando o *E. urograndis*. Além disso, o entendimento do impacto na vegetação nativa é essencial, uma vez que muitos desses plantios são cercados por vegetação nativa. Além disso, tal

entendimento é fundamental na utilização de plantios mistos de eucalipto com espécies nativas, na restauração de áreas com eucalipto e/ou seus resíduos e da possível utilização do híbrido como espécie pioneira para restauração com espécies nativas. Sendo fundamental avaliar o potencial alelopático das folhas *E. urograndis* e sua composição química, para entender como o híbrido poderia afetar outras espécies vegetais.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial alelopático e a composição fitoquímica de extratos etanólicos e suas frações de polaridades diferentes, obtido a partir de folhas maduras e serrapilheira do híbrido *Eucalyptus urograndis*, utilizando como plantas receptoras uma espécie cultivada, *Lactuca sativa* L. e uma espécie nativa, *Cedrela fissilis* Vell..

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito alelopático dos extratos e suas frações na germinação e crescimento inicial da espécie cultivada, *Lactuca sativa* L. e da nativa, *Cedrela fissilis* Vell.
- Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos foliares e suas frações de *E. urograndis* por técnicas cromatográficas
- Comparar a atividade alelopática dos diferentes extratos e frações testadas e identificar o mais ativo.
- Comparar a alelopatia em função do tipo de vegetal (folhas maduras e serrapilheira).
- Analisar a influência negativa de *E. urograndis* em uma espécie nativa (*Cedrela fissilis*), para sua possível consorciação em plantios, visando a redução dos danos causados pelas monoculturas
- Avaliar o efeito do híbrido em *L. sativa* visando a sua utilização na composição de sistemas agroflorestais

## 4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### Alelopatia

A alelopatia é um processo natural e vem sendo estudada a muitos anos, a primeira definição do termo foi desenvolvida por Molisch em 1937. Atualmente a alelopatia é definida, segundo IAS (1996) como “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários gerados por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos”. Os compostos químicos provenientes do metabolismo secundário que influenciam outros organismos, de forma negativa ou positiva, direta ou indireta, são denominados aleloquímicos (REIGOSA et al., 2013; CHENG; CHENG, 2015; HE et al., 2019). Os aleloquímicos podem ser encontrados em várias partes das plantas com concentrações variáveis e sua liberação no ambiente se dá de diferentes formas, como indicado na Figura 1 (ALBUQUERQUE et al., 2011, REIGOSA et al., 2013).

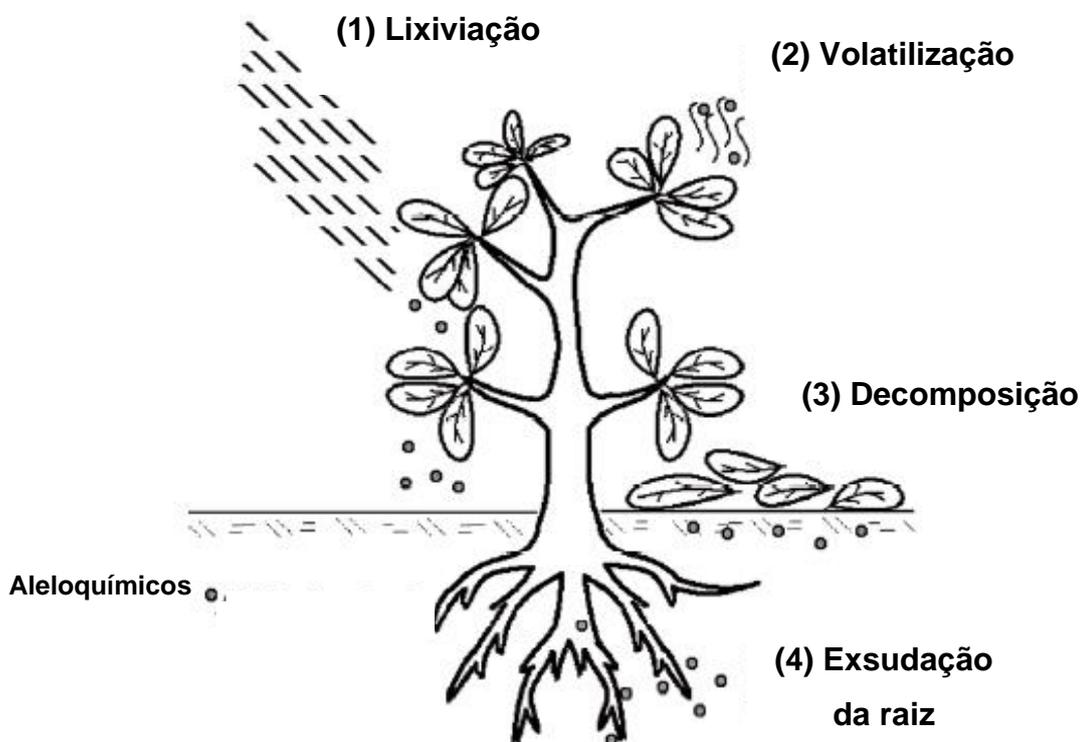


Figura 1. Vias de liberação de aleloquímicos no ambiente (adaptado de ALBUQUERQUE et al., 2011).

Os metabólitos secundários têm sua produção determinada geneticamente e sofrem a influência do meio no qual a planta está inserida (HADACEK, 2002). Vários fatores, bióticos e abióticos, estimulam a síntese de aleloquímicos pelas plantas, bem como sua liberação no ambiente, entre eles: doenças, ataque de insetos, seca, altas temperaturas, irradiação, competição com outras plantas, falta de nutrientes e outros (ALBUQUERQUE et al., 2011; CHENG; CHENG, 2015).

Os metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e são produzidos pelas plantas como uma forma de defesa contra ataques de insetos, herbivoria, patógenos, competição com outras plantas e estresse em geral e também são liberados para atrair polinizadores, dispersores e micro-organismos que realizam simbiose (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005, TAIZ et al., 2017).

Segundo Taiz et al. (2017) os aleloquímicos em geral podem ser divididos em três grandes classes: os terpenos, os compostos fenólicos e os alcaloides. Sendo, grande parte desses metabólicos biosintetizado a partir das rotas do ácido chiquímico, ácido malônico, ácido mevalônico e metileritol fosfato (MEP) (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os aleloquímicos são, em sua maioria, produtos do metabolismo secundário e podem ser agrupados em 14 grupos, com base na composição química: ácidos orgânicos solúveis, álcoois de cadeia simples, aldeídos alifáticos e cetonas; lactonas insaturadas; ácidos graxos de cadeia longa e poliactilenos; benzoquinona, antraquinona e quinonas complexas; fenóis simples, ácido benzóico e derivados; ácido cinâmico e seus derivados; cumarina; flavonóides; taninos; terpenóides e esteróides, aminoácidos e peptídeos, alcaloides e cianidrinias; sulfetos e glucosinolatos; purinas e nucleosídeos (RICE, 1984).

Os aleloquímicos tem influência, direta ou indireta, a nível molecular e celular e isso reflete na planta como um todo, podendo afetar inclusive a germinação e crescimento (RIZVI et al., 1992). Tais compostos podem interferir na divisão e alongamento celular, alteração na membrana celular e na sua permeabilidade, redução da eficiência da fotossíntese, cloroplastos, movimento estomático, síntese de pigmentos, na respiração, afetando seus estágios, atividade enzimática, síntese de proteínas e DNA, absorção de nutrientes e água, balanço hídrico, desbalanço hormonal e nos sistema antioxidante entre outros (RIZVI et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2014; CHENG; CHENG, 2015).

Muitos compostos secundários tem sua atividade alelopática conhecida como por exemplo, os fenóis, ácido salicílico, ácido caféico, ácido ferúlico e naftoquinonas entre outros; os alcaloides, como ácido metil butanoico e ácido cinâmico; os flavonoides quercetina,

rutina e kaempferol; as ligninas ácido clorogênico, taninos e polifenóis, os terpenos, como  $\alpha$ -pineno, citronelol, mentol, canfora e glicosídeos, como as saponinas (KHAN et al., 2018). Estes compostos estão sendo cada vez mais estudados e utilizados na agricultura como alternativa a herbicidas sintéticos, dos quais muitas ervas daninhas vêm demonstrando resistência (FERRREIRA: AQUILA, 2000; ALBUQUERQUE et al., 2011; ASLAM et al., 2016; KHAN et al., 2018).

Muitas espécies já tiveram suas propriedades alelopática demonstradas, como *Medicago sativa* L. (alfavaca), os cereais *Oryza sativa* L. (arroz), *Secale cereale* L.(centeio), *Triticum aestivum* L.(trigo), *Hordeum vulgare* L.(cevada), *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (sorgo); *Avena strigosa* Schreb (aveia preta); *Helianthus annuus* L. (girassol); e arbóreas *Juglans nigra* L. (noz preta), *Leucaena leucocephala* (Lam.) (leucena), *Quercus robur* L. (carvalho-alvarinho), espécies do gênero *Pinus* e *Acacia* e entre elas diversas espécies do gênero *Eucalyptus* (FERRREIRA: AQUILA, 2000; ALBUQUERQUE et al., 2011; ASLAM et al., 2016; KHAN et al., 2018).

### **O gênero *Eucalyptus***

O gênero *Eucalyptus* L'Hér., da família botânica *Myrtaceae*, abrange 13 subgêneros e soma mais de 800 espécies, a maior parte delas tendo origem na Austrália (BROOKER, 2002). No entanto, um número restrito de espécies (em torno de 20) são usadas mundialmente para atender a demanda comercial (PINTO-JUNIOR et al., 2014).

As espécies de *Eucalyptus* são árvores de crescimento rápido, com folhas simples e opostas com pontuações translúcidas, flores cimosas geralmente brancas e com florações abundantes. É o gênero com maior importância econômica da família *Myrtaceae* (SOUZA; LORENZI, 2012).

O eucalipto foi introduzido no Brasil, muito provavelmente, em 1825 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e nos anos de 1861 a 1863 no interior de São Paulo, em que foram plantados *E.gigantea* e *E. globulus*, respectivamente (PEREIRA et al., 2000; FOELKEL, 2005). Há registros também que indicam a introdução em 1868 no Rio Grande do Sul, onde se originaram as primeiras plantações (FOELKEL, 2005; PINTO-JUNIOR et al., 2014). Seu cultivo pelo país foi aumentando, com a possibilidade de utilização de eucalipto como lenha e carvão e para a produção de celulose, mas a silvicultura de eucalipto se tornou sólida a partir de 1966, com incentivos fiscais do governo (FOELKEL, 2005).

No Brasil, ele é cultivado em larga escala, principalmente em sistemas de monocultura, ocupando grandes áreas. Segundo a Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ (2019), em 2018 o eucalipto ocupava uma área de 5,7 milhões de ha, que representa 72,8 % do total de área de florestas plantadas. Os estados com maiores áreas ocupadas por eucalipto, em hectares, são: Minas gerais (1,3 milhões), São Paulo (0,93 milhões), Mato Grosso de Sul (0,9 milhões), Bahia (619,5 mil), Rio Grande do Sul (308,6 mil) e o Espírito Santo, na 6ª posição, com 228,5 mil hectares de plantações de *Eucalyptus* (IBÁ, 2019). No entanto, a área ocupada pode ser ainda maior. Segundo o IBGE no mesmo ano a área destinada ao cultivo de eucalipto foi de 7,5 milhões de hectares, correspondendo a 76,2% do total as áreas ocupadas pela silvicultura (9,9 milhões de ha) (IBGE, 2018).

A diversificação na sua utilização, suas altas taxas de crescimento e sua plasticidade fenotípica fazem com que o eucalipto domine as áreas de plantios para fins comerciais em vários países (CHENGXU et al., 2011; PINTO-JUNIOR et al., 2014). O eucalipto pode ser usado para diferentes finalidades, sejam madeireiros ou energéticos, como por exemplo, para a produção de celulose e papel, carvão e lenha, madeira em toras, madeiras serrada, painéis e compensados que podem ser usados na indústria moveleira ou na construção civil e, também pode ser utilizado para a produção de óleos essenciais pelas indústrias farmacêuticas (SOUZA; LORENZI, 2012; SANTAROSA et al., 2014).

No estado do Espírito Santo, o eucalipto é cultivado, principalmente, como matéria prima para a produção de celulose de fibra curta e utilizado pela empresa Fibria. A Fibria, que até 2008 se chamava Aracruz Celulose, é uma empresa brasileira que lidera a produção mundial de celulose a partir de eucalipto. A empresa planta principalmente clones obtidos através de melhoramento genético clássico e que melhor atendam as necessidades e sejam tolerantes as adversidades impostas pelo meio (FIBRIA, 2014). Em 2017, a empresa possuía 656 mil hectares de plantações de eucalipto pelo país e produziu 5,64 milhões de toneladas de celulose (FIBRIA, 2017). Em 2018, houve a fusão da Fibria e a Suzano Papel e Celulose, com isso a área plantada com eucalipto subiu para 1,3 milhões de ha pertencentes a empresa e a capacidade de produzir celulose subiu para 10,9 milhões de toneladas (SUZANO, 2018).

### **Impactos das plantações**

Assim como outras monoculturas, alguns efeitos negativos podem ser observados nas plantações. Em estudo com populações de formigas presentes em plantações de *E. saligna*, os pesquisadores verificaram a redução da diversidade e que as populações se

tornaram funcionalmente homogêneas, quando comparadas as populações de formigas de uma área de Mata Atlântica próxima (MARTELLO et al., 2018).

Outro efeito associado a plantações de eucalipto é a influências dos estoques de carbono no solo mineral. Analisando amostras de solo de três localidades do Brasil, na Bahia (região 1), Espírito Santo e sul da Bahia (região 2) e São Paulo (região 3), os autores verificaram uma pequena diminuição de carbono nos solos da região 2 (COOK et al., 2016). Além disso, estudos demonstraram que o eucalipto pode compactar o solo e provocar a deficiência de água no interior das plantações (YANG et al., 2017).

Souza et al. (2013) constataram que a substituição da vegetação nativa por plantações de eucalipto afeta as espécies nativas de pastagens no interior e no entorno das plantações, alterando a composição florísticas e a diversidade de espécies.

Estudando a regeneração natural de uma área de cerrado com *Eucalyptus spp.*, Neri et al. (2005) verificaram que a diversidade no sub-bosque de eucalipto era menor do que a diversidade de outras áreas de cerrado. Evaristo et al. (2016), estudando cinco plantações de *E. citriodora* (= *Corumbya citriodora*) abandonadas a 11 anos, através da análise de diversidade e riqueza, constataram que a regeneração natural nas áreas estudadas era baixa e este resultado pode ser explicado pelo possível efeito alelopático do eucalipto.

### **Alelopatia no gênero**

Diversos estudos já reportaram o efeito alelopático de várias espécies do gênero, utilizando extratos foliares aquosos e etanólicos e, também, óleos essenciais. Em estudo conduzido na China com *Eucalyptus urophylla*, verificou-se a inibição do crescimento de três espécies arbóreas nativas semeadas no interior da plantação de eucalipto (CHU et al., 2014). Song et al. (2019), estudando a alelopatia de lixiviados das folhas *E. urophylla* pela chuva, verificaram que os aleloquímicos lixiviados inibiam a germinação e diminuía a sobrevivências de mudas de três espécies nativas testadas.

Estudos com *Eucalyptus globulus* demonstraram efeito inibitório de extratos aquosos e a possibilidade de sua utilização como bioerbicida pré emergência, por provocar a inibição da germinação e crescimento das plântulas (MORSI; ABDELMIGID, 2016; PUIG, 2018).

Zhang et al. (2012) avaliaram a fitotoxicidade do óleo essencial de quatro espécies, *E. salubris*, *E. dundasii*, *E. brockwayii* e *E. spathulata*. Os óleos essenciais testados afetaram a germinação e crescimento de *Solanum elaeagnifolium*, sendo observados efeitos mais pronunciados para *E. salubris* e menos evidente para *E. spathulata*. Benchaa et al. (2018)

observaram respostas semelhantes ao avaliar o óleo essencial de *E. citriodora* sobre ervas daninhas, inibindo a germinação e crescimento.

Já foram relatados efeitos alelopáticos para *E. grandis*, em que extratos aquosos inibiam a germinação e crescimento de alface (SOUZA; CARDOSO, 2013) e extratos aquosos das raízes e o solo da rizosfera de plantações com idade de 2 a 10 anos causaram inibição da germinação e no crescimento inicial de *Raphanus sativus*, *Phaseolus aureus* e *Lolium perenne*, sendo observado maiores efeitos inibitórios para as plantações mais jovens (ZHANG et al., 2010).

Extratos brutos (etanólicos e aquoso) de *E. erythrocorys* inibiram tanto a germinação quanto o crescimento de duas plantas daninhas e trigo testadas, afetando principalmente o crescimento da radícula (GHNAYA et al., 2015).

Ghanuni et al. (2015), investigando a atividade alelopática do solo da plantação, folhas moídas incorporadas ao solo e extrato aquoso das folhas de *E. camaldulensis* em sementes de *Arachis hypogaea* e tubérculos *Cyperus rotundus*, observaram redução significativa na germinação e crescimento inicial das espécies receptoras.

### **Híbrido *Eucalyptus urograndis***

*Eucalyptus urograndis* é um híbrido produzido no Brasil entre as espécies *Eucalyptus urophylla* S.T. Blakee e *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, originárias do Timor - Indonésia e Nova Gales do Sul/Queensland – Austrália, respectivamente (SANTAROSA et al., 2014). O híbrido resultante foi selecionado e passou a ser clonado por apresentar características de interesse principalmente para a indústria, como a alta produtividade, vinda de *E. grandis* e tolerância a *Cryphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto, herdada de *E. urophylla* (MARTINS; IKEMORI, 1987)

O híbrido é recomendado para áreas de clima tropical e atualmente é um dos mais utilizados em plantios comerciais em vários estados do país, como Pará, Maranhão, Bahia, Espírito Santo e Rio Grande do Sul e em outros países como Colômbia, Venezuela, África do Sul, Congo e China (SANTAROSA et al., 2014).

### **Atividade biológica de *E. urograndis***

De maneira semelhante as espécies do gênero *Eucalyptus*, estudos demonstraram a atividade biológica do híbrido. Goldbeck et al. (2014), investigando a bioatividade do óleo essencial de *E. urograndis*, verificaram efeito bactericida sobre uma bactéria causadora de cárie, *Streptococcus mutans*. O óleo essencial do híbrido também mostrou eficácia na inibição de *Staphylococcus aureus* (CARDOSO et al., 2019)

Em estudos com plantas do híbrido e extrato aquoso foliar de *E. urograndis* com o objetivo de controlar a floração de algas e melhorar a qualidade da água no lago Taihu - China, verificou-se a inibição do crescimento da população de algas nas parcelas tratadas, sendo o híbrido plantado na parcela mais eficiente na inibição da comunidade de algas (ZHAO et al., 2019).

Seu potencial inseticida também foi estudado, em que o óleo essencial do híbrido apresentou ação inseticida e repelente contra ninfas de *Rhodinus neglectus*, sendo considerado pelos autores uma possível alternativa de controle de ninfas desses triatomíneos (GOMES; FAVERO, 2013).

A atividade alelopática de *E. urograndis* foi demonstrada por meio de extratos aquosos foliares sobre a germinação e crescimento inicial das gramíneas forrageiras *Urochloa decumbens* e *Panicum maximum*, sendo o Índice de Velocidade de Germinação e o comprimento da radícula as variáveis mais afetadas (CARVALLHO et al., 2015)

Espinosa-Garcia et al. (2008) constataram que o solo da plantação do híbrido em Tabasco no México tinha efeito alelopático, afetando a germinação e crescimento do milho, feijão, melão e pepino.

Em estudo com extratos foliares aquosos do híbrido, foi observada a influência dos extratos na germinação e crescimento de *Pennisetum glaucum* (milheto), sendo evidente seu efeito alelopático sobre a espécie receptora (SOUZA et al., 2018).

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBUQUERQUE, M. B. et al. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agron. Sustain. Dev.**, v. 31, p. 379-395, 2011.

- ALENCAR, A.L. Regeneração natural avançada de espécies arbóreas nativas no sub-bosque de povoamentos de *Eucalyptus saligna* Smith., na Zona da Mata Sul de Pernambuco. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 183-192, 2011.
- ASLAM, F.; KHALIQ, A.; MATLOOB, A.; TANVEER, A.; HUSSAIN, S.; ZAHIR, Z.A. Allelopathy in agro-ecosystems: a critical review of wheat allelopathy-concepts and implications. **Chemoecology**, 2016.
- BARBOSA, L.C.A.; FILOMENO, C.A.; TEIXEIRA, R.R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. **Molecules**, n. 21, 2016.
- BROOKER, I. Botany of the eucalypts. In: Coppen, J.J.W. **Eucalyptus: The genus Eucalyptus**. Taylor and Francis, London, p. 3-35, 2002.
- BENCHAA, S.; HAZZIT, M.; ABDELKRIM, H. Allelopathic Effect of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil and Its Potential Use as Bioherbicide. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 8, 2018.
- CARDOSO, R.C. et al. Potencial antimicrobiano do óleo da folha de *Eucalyptus urograndis* frente *Stafilococcus aureus*. **Id on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v.13, n. 43, p. 989-1002, 2019.
- CARVALHO, P.C.F. et al. Definições e terminologias para Sistema Integrado de Produção Agropecuária. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 5 (Especial), p. 1040-1046, 2014.
- CARVALHO, F.P. et al. The allelopathic effect of *Eucalyptus* leaf extract on grass forage seed. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 33, n. 2, p. 193-201, 2015.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE R.A.; PERES L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: Teoria e prática**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 650p., 2005.
- CECCON, E. Production of bioenergy on small farms: a two-year agroforestry experiment using *Eucalyptus urophylla* intercropped with rice and beans in Minas Gerais, Brazil. **New Forests**, v. 35, p. 285–298, 2008.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, art. 1020, p. 1-16, 2015.

- CHENGXU, W. et al. Review on allelopathy of exotic invasive plants. **Procedia Engineering**, v. 18, p. 240-246, 2011.
- CHU, C.; MORTIMER, P.E.; WANG, H.; WANG, Y.; LIU, X.; YU, S. Allelopathic effects of *Eucalyptus* on native and introduced tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 323, p. 79–84, 2014.
- COOK, R.L.; BINKLEY, D.; STAPE, J.L. *Eucalyptus* plantation effects on soil carbon after 20 years and three rotations in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.359, p. 92–98, 2016.
- ESPINOSA-GARCÍA, F.J.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E.; QUIROZ-FLORES, A. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp plantations on germination and early growth of annual crops. **Allelopathy Journal**, v. 21, n. 1, pg. 25-37, 2008
- EVARISTO, V.T.; BRAGA, J.M.A.; NASCIMENTO, M.T. Atlantic Forest regeneration in abandoned plantations of eucalypt (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill and L.A.S.Johnson) in Rio de Janeiro, Brazil, **Interciencia**, v. 36, n. 6, pg. 431-436, Caracas, Venezuela, 2016.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 (edição especial), pg.175-204, 2000.
- FIBRIA. **Relatório anual**. 2014
- FIBRIA. **Relatório anual 2017: uma floresta de oportunidades**. 2017.
- FOELKEL, C. E. B. Eucalipto no Brasil, uma história de pioneirismos. **Visão Agrícola**, n. 4, p. 66-69, 2005.
- GHANUNI, A.M. et al. Allelopathic effect of (*Eucalyptus camaldulensis*) on peanut (*Arachis hypogaea*) crop and purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) weed. **Scholarly Journal of Agricultural Science**, v. 5, n.6, p. 189-194, 2015.
- GHANAYA, A.B.; HAMROUNI, L.; AMRI, I.; AHOUES, H.; HANANA, M.; ROMANE, A. Study of allelopathic effects of *Eucalyptus erythrocorys* L. crude extracts against germination and seedling growth of weeds and wheat. **Natural Product Research**, v. 30, n. 18, p. 2058–2064, 2015.

GOLDBECK, J.C. et al. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 304–309, 2014.

GOMES, S.P.; FAVERO, S. Assessment of the insecticidal potential of *Eucalyptus urograndis* essential oil against *Rhodnius neglectus* Lent (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 431–435, 2013.

HADACEK, F. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 273-322, 2002.

HE, S.L.; WANG, S.Q.; WANG, Q.Y.; ZHANG, C. Y.; ZHANG, Y.M.; LIU, T.Y.; YANG, S.X.; KUANG, Y.; ZHANG, Y.X.; HAN, J.Y.; QIN, J.C. Allelochemicals as growth regulators: A review. **Allelopathy Journal**, n. 48, v. 1, p. 15-26, 2019.

IAS – International Allelopathy Society. 1996. Constitution and Bylaw of IAS. Cadiz-Spain, **IAS Newsletter**.

IGBE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-8, 2018.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁVORE – IBÁ. **Relatório anual**. 2019.

KHAN, A. et al. Allelopathy: an overview. **FUFAST Journal of Biology**, v. 8, n. 2, p. 331-350, 2018.

MARTELLO, F.; BELLO, F.; MORINI, M.S.C.; SILVA, R.R.; SOUZA-CAMPANA, D.R.; RIBEIRO, M.C.; CARMONA, C.P. Homogenization and impoverishment of taxonomic and functional diversity of ants in *Eucalyptus* plantations. **Scientific Reports**, n. 8, p. 3266, 2018.

MARTINS, F.C.G.; IKEMORI, Y.K. Produção de híbridos de eucalipto na Aracruz. **Trabalho apresentado na Reunião sobre Técnicas para Produção de Híbridos**. ESALQ-USP, Piracicaba, 1987.

MORAES, L.F.D.; AMÂNCIO, C.O.G.; RESENDE, A.S. Sistemas agroflorestais para o uso sustentável do solo: considerações agroecológicas e socioeconômicas. **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, 2011.

MORSI, M.M.; ABDELMIGID, H.M. Allelopathic activity of *Eucalyptus globulus* leaf aqueous extract on *Hordeum vulgare* growth and cytogenetic behavior. **Australian Journal Crop Science**, v. 10, n. 11, p. 1551-1556, 2016.

NERI, A.V.; CAMPOS, E.P.; DUARTE, T.G.; NETO, J.A.A.M.; SILVA, A.F.; VALENTE, G.E. Regeneração de espécies nativas lenhosas sob plantio de *Eucalyptus* em área de Cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 19, n. 2, p. 369-376, 2005.

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 41-47, 2014.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: **Embrapa Florestas**, 113p. (Embrapa Florestas. Documentos, 38), 2000.

PINTO JUNIOR, J.E.; SANTAROSA, E.; GOULART, I.C.G.R. Histórico do cultivo de eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. **Transferência de tecnologia florestal**. Embrapa, Brasília - DF, p.11-12, 2014.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. ED. Omnipax, Curitiba – PR, p. 95-124, 2011.

PUIG, C.G.; REIGOSA, M.J.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; PEDROL, N. Unraveling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.

REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.

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

SANTAROSA, E.; PINTO JUNIOR, J.E.; GOULART, I.C.G.R.; PENTEADO JÚNIOR, J.F. Importância socioeconômica e principais uso do eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. **Transferência de tecnologia florestal**. Embrapa, Brasília - DF, p.13-22, 2014.

SILVA, J.; FORTES, A.M.T.; GOMES, F.M.; PINTO, T.T; BONAMIGO, T.; BOIAGO, N.P. Alelopatia de *Camelina sativa* Boiss. (Brassicaceae) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa* (L.) e *Glycine max* (L.) Merr.. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p.17-24, 2011.

SONG, O.; QIN, F.; HE, H.; WANG, H.; YU, S. Allelopathic potential of rain leachates from *Eucalyptus urophylla* on four tree species. **Agroforestry Systems**, v. 93, p. 1307–1318, 2019.

SOUZA, P.B. et al. Florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea do sub-bosque de um povoamento de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em VIÇOSA, MG, BRASIL. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.3, p.533-543, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. São Paulo: Instituto Plantarum, 3ª edição, 2012.

SOUZA, A.F. et al. Afforestation effects on vegetation structure and diversity of grasslands in southern Brazil: The first years. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, p. 56– 62, 2013.

SOUZA, V. M.; CARDOSO, S.B. Efeito alelopático do extrato de folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão). **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 3, n.2, p. 01-06, 2013.

SOUZA, A. F.; RAMOS, N. P.; PIZO, M. A.; HÜBEL, I.; CROSSETTI, L. O. Afforestation effects on vegetation structure and diversity of grasslands in southern Brazil: The first years. **Journal for Nature Conservation**, n. 21, p. 56– 62, 2013.

SUZANO. **Relatório**. 2018

- SOUZA, M.V. et al. Allelopathy of the leaf extract of *Eucalyptus* genetic material on the physiological performance of millet seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 34-45, 2018.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3ª edição, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6ª edição, 2017.
- VIANA NERI, A.V.; CAMPOS, E.P.; DUARTE, T.G.; MEIRA NETO, J.A.A.; SILVA, A.F.; VALENTE, G.E. Regeneração de espécies nativas lenhosas sob plantio de *Eucalyptus* em área de Cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. **Acta bot. bras.**, n. 19, v. 2, p. 369-376, 2005.
- VITAL, M.H.F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 235-276, dez. 2007
- YAKUBU, I.; AMINU, S.A.; ABDLLAHI, M. Influence of Allelochemicals Substances in *Eucalyptus* Species on Agricultural Crops: A Review. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v.5, n.5, p. 25-32, 2018.
- YANG, X.; LI, D.; MCGROUTHER, K.; LONG, W.; LI, Y.; CHEN, Y.; LV, X.; NIAZI, N.K.; SONG, Z.; WANG, H. Effect of *Eucalyptus* forests on understory vegetation and soil quality. **J Soils Sediments**, n. 17, p. 2383–2389, 2017.
- ZENG, R.S.; MALLIK, A.U.; LUO, S. **Allelopathy in sustainable agriculture and forestry**. New York: Springer Verlag, 426p. 2010.
- ZHANG, D. et al. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. **Ecological Research**, v. 25, p. 13–23, 2010.
- ZHANG, J.; AN, M.; WU, H.; LIU, D.L.; STANTON, R. Chemical composition of essential oils of four *Eucalyptus* species and their phytotoxicity on silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.). **Plant Growth Regul.**, v. 68, p. 231–237, 2012.
- ZHAO, W. et al. Evaluation of the use of eucalyptus to control algae bloom and improve water quality. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 412–418, 2019.

# Capítulo 1 - Potencial alelopático e composição fitoquímica dos extratos foliares do híbrido *Eucalyptus urograndis* clone PL3335

Autores:

Maria Gabriela Marques de Souza<sup>1</sup>

Viviana Borges Corte <sup>1</sup>

Hildegardo Seibert França<sup>2</sup>

\*Autor para correspondência: gabitupinikim@gmail.com

Periódico a ser submetido: PlosOne.

## Resumo

O híbrido *Eucalyptus urograndis* (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blakee x *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.) é um dos eucaliptos mais plantados no Brasil, no entanto o estudo sobre seu efeito alelopático sobre plantas cultivadas e nativas é incipiente. Tendo em vista a sua utilização em sistemas agroflorestais e na restauração ambiental e seu possíveis impactos na regeneração natural, o potencial alelopático do híbrido necessita de investigação. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial alelopático e composição química de *E. urograndis* na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. e *Cedrela fissilis* Vell.. Para tal, foram coletadas folhas maduras e da serrapilheira e após secagem preparou-se extratos etanólico e posteriormente foi realizado o fracionamento, obtendo-se as frações de hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEtOH), butanol (BuOH) e aquosa (Aq). Um bioensaio de germinação foi realizado para testar o potencial alelopático dos extratos etanólicos e frações dos dois tipos foliares, utilizando *Lactuca sativa* e *Cedrela fissilis* como espécies receptoras, nas concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL e controle (0mg/mL). Foram avaliados a porcentagem de germinação (%G), Índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento, massa fresca e seca da parte aérea e radícula das plântulas. Os extratos etanólicos e frações Hex e DCM, afetaram negativamente todas as variáveis analisadas e as

---

<sup>1</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, CEP 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil

demais frações exerceram maior influência no crescimento, sendo o comprimento da radícula o parâmetro mais afetado nas plântulas de alface. Enquanto o cedro rosa teve sua germinação e crescimento reduzida em todos os extratos e frações. A fração DCM foi mais ativa, provocando maior inibição na germinação e crescimento inicial das duas espécies receptoras. As análises químicas revelaram a presença de vários aleloquímicos com a atividade já conhecida, como monoterpenos, sesquiterpenos, triterpeno, esteróis, compostos fenólicos, ácidos orgânicos. Com base nos resultados, o híbrido apresenta potencial alelopático e potencial para utilização como bioerbicida, por conta da grande atividade inibitória da fração DCM sobre a germinação e crescimento das duas espécies receptoras. O híbrido *E. urograndis* teve efeitos negativos sobre *C. fissilis* e, portanto, seu plantio em consorciado não é indicado.

**Palavras-chave:** Aleloquímicos • cedro rosa • eucalipto • extratos foliares • fitotoxicidade

### **Abstract**

The hybrid *Eucalyptus urograndis* (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blakee x *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.) Is one of the most planted eucalyptus in Brazil, however the study on its allelopathic effect on cultivated and native plants is incipient. In view of its use in agroforestry systems and environmental restoration and its possible impacts on natural regeneration, the allelopathic potential of the hybrid needs further investigation. The aim of this study was to investigate the allelopathic potential and chemical composition of *E. urograndis* in the germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. and *Cedrela fissilis* Vell.. For this purpose, mature and litter leaves were collected and after drying, it was prepared ethanol extracts and subsequently fractionation was performed, obtaining the fractions of hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) and aqueous (Aq). A germination bioassay was performed to test the allelopathic potential of ethanol extracts and fractions of the two leaf types, using *Lactuca sativa* and *Cedrela fissilis* as recipient species, in concentrations of 1.25; 2.5; 5.0 and 10 mg/mL and control (0mg / mL). The germination percentage (%G), Germination speed index (GSI) and length, fresh and dry mass of the aerial part and root of the seedlings were evaluated. The ethanolic extracts and Hex and DCM fractions, negatively affected all the variables analyzed and the other fractions had a greater influence on growth, with the radicle length being the parameter

most affected in lettuce seedlings. While the cedar rose had its germination and growth reduced in all extracts and fractions. The DCM fraction was more active, causing greater inhibition in the germination and initial growth of the two receptor species. Chemical analyzes revealed the presence of several allelochemicals with the already known activity, such as monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, sterols, phenolic compounds, organic acids. Based on the results, the hybrid has allelopathic potential and potential for use as a bioherbicide, due to the great inhibitory activity of the DCM fraction on the germination and growth of the two receptor species. The hybrid *E. urograndis* had negative effects on *C. fissilis* and, therefore, its intercropping is not indicated.

**Keywords:** allelochemicals • cedar rose • eucalyptus • leaf extracts • phytotoxicity

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. (*Myrtaceae*), é originário da Austrália e ilhas próximas e possui mais de 800 espécies (BROOKER, 2002). Pelo menos 20 espécies do gênero são plantadas para fins comerciais no Brasil e em outras partes do mundo (PINTO-JUNIOR et al., 2014). O eucalipto é plantado em grande escala no Brasil e a cada ano a área destinada a essa cultura aumenta – um aumento de cerca de 1,3% de 2017 para 2018 acumulando 7,5 milhões de hectares de área ocupada na forma de monocultura (IBGE, 2018).

Com o plantio extensivo de eucalipto, alguns efeitos negativos podem ser associados as plantações, como baixa diversidade de espécies no sub-bosque das plantações, quando comparado a áreas de vegetação nativa no entorno (NERI et al., 2005; SOUZA et al. 2013), regeneração natural lenta (EVARISTO et al., 2016), compactação do solo, déficit hídrico nas plantações (YANG et al., 2017), baixa diversidade de fauna no interior dos talhões (MARTELLO et al., 2018), influência nos estoques de carbono do solo (COOK et al., 2016) entre outros efeitos, são geralmente associados a forma com que as plantações são manejadas e a potencial alelopatia do eucalipto.

Estudos prévios sobre a composição química e atividade alelopática de eucalipto demonstraram que várias espécies do gênero continham aleloquímicos com potencial alelopático e inibiam a germinação e crescimento de outras espécies de plantas, como os compostos fenólicos e os terpenos (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; YAKUBU et al., 2018). Sendo os principais componentes de óleos essenciais de eucalipto, os terpenos citronelol, citronelal, eucaliptol,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, espatulenol entre outros (BARBOSA et al., 2016).

Os compostos fenólicos são encontrados principalmente no solo e nos extratos aquosos de *Eucalyptus*, entre eles narigenina, rutina, quercetina, kaempferol, e os ácidos clorogênico, cumárico, ferúlico, gálico, cafeico entre outros (CHAPUIS-LARDY et al., 2002; SANTOS et al., 2012; PUIG et al., 2018).

O *Eucalyptus urograndis* é um híbrido resultante do cruzamento de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blakee e *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden., originado inicialmente de maneira natural e posteriormente clonado (SANTAROSA et al., 2014). No Brasil, atualmente, é um dos mais plantados comercialmente, estando presente em vários estados como, Pará, Maranhão, Bahia, Espírito Santo e Rio Grande do Sul e em outros países como a Venezuela, Colômbia, Congo, África do Sul e China (SANTAROSA et al., 2014).

Estudos apontam que o eucalipto pode ser utilizado em sistemas agroflorestais (CECCON, 2008) e na restauração de áreas, na qual o eucalipto desempenharia o papel de espécie facilitadora promovendo o desenvolvimento das espécies nativas (SOUZA et al., 2007; ALENCAR et al., 2011). O *E. urograndis* poderia compor esses sistemas e servir de suporte para outras espécies, dada seu rápido crescimento e resistência ao cancro, no entanto, os impactos das plantações sobre a flora bem como a composição química devem ser investigados. Muitas espécies nativas podem ser utilizadas nesses sistemas integrados de produção, como por exemplo o cedro rosa (*Cedrela fissilis* Vell.), com alto valor econômico de sua madeira e muito utilizada em reflorestamento (PEREIRA et al., 2017; MELOTTO et al., 2019).

Sabe-se que o extrato aquoso de folhas de *E. urograndis* (CARVALHO et al., 2015; SOUZA et al., 2018) e o solo (ESPINOSA-GARCÍA et al., 2008) de suas plantações apresentam atividade alelopática em espécies cultivadas. No entanto, estudos sobre o híbrido e sua composição química são escassos, principalmente a respeito de seus possíveis efeitos negativos em espécies nativas. Com isso os impactos das plantações sobre a flora bem como a composição química devem ser investigados.

Além disso, o estudo das potencialidades alelopáticas de uma planta são relevantes atualmente em que se vem buscando alternativas para o controle de ervas daninhas resistentes aos herbicidas sintéticos (ZENG et al., 2010; FERREIRA; ÁQUILA, 2000). A possível utilização dos restos culturais de *E. urograndis* na produção de bioerbicidas ajudaria na mitigação dos impactos causados pelas suas plantações.

Apesar da sua importância econômica e sua ampla utilização, os estudos sobre o híbrido são insipientes, principalmente em relação a seu impacto na vegetação nativa. Dado seu potencial para produção de compostos bioativos, na composição de sistemas integrados de produção agrícola, de restauração e a regeneração de plantações abandonadas ou solos com resíduos de eucalipto, a investigação de seu potencial alelopático se faz necessária.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial alelopático e a composição fitoquímica de extratos etanólicos e suas frações de polaridades diferentes, obtidos a partir de folhas maduras e serrapilheira do híbrido *Eucalyptus urograndis*, utilizando como plantas receptoras uma espécie cultivada, *Lactuca sativa* L. e uma espécie nativa, *Cedrela fissilis* Vell..

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

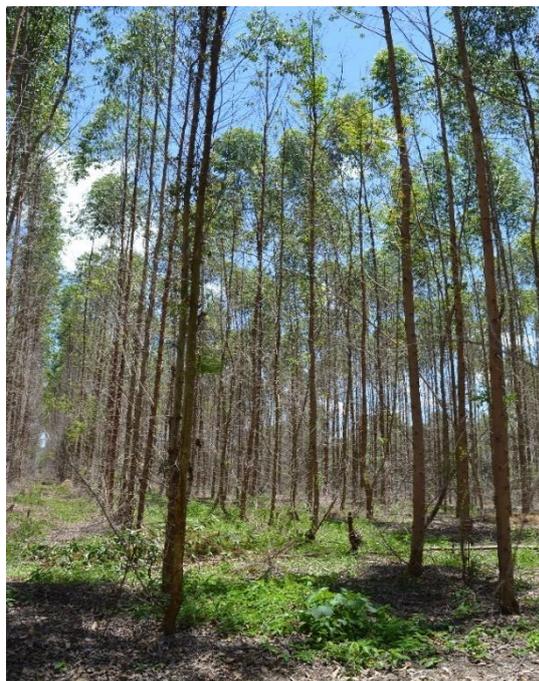
### **2.1. Espécies estudadas e coleta do material vegetal**

Para se avaliar o potencial alelopático do híbrido *Eucalyptus urograndis* (*Myrtaceae*), resultante do cruzamento de *E. urophylla* x *E. grandis*, foram coletadas folhas maduras, totalmente desenvolvidas, e folhas superficiais da serrapilheira da plantação, limpas e sem vestígios de contaminação por fungos. O material vegetal foi coletado em área pertencente a empresa Fibria, no município de Aracruz – ES (19°80'92.7"S 40°15'90.5"W) (Figura 2). A coleta foi realizada no dia 05 de dezembro de 2018, em plantação clonal do híbrido, clone PL3335, com 4 anos de idade (plantado em 31 de outubro de 2014), na Área 27, Talhão 05.

As espécies selecionadas para testar a atividade alelopática dos extratos foram *Lactuca sativa* L. var. cinderela, espécie conhecida como sensível a compostos alelopáticos e muito utilizada em estudos dessa natureza (FERREIRA; AQUILA, 2000; REIGOSA et al., 2013) e uma espécie nativa *Cedrela fissilis* Vell., conhecida popularmente como cedro rosa, com ocorrência em todo Brasil, exceto Roraima, Amapá, Rio Grande do Norte e Paraíba (FLORA DO BRASIL 2020) e muito utilizadas em reflorestamentos e sistemas integrados de produção (PEREIRA et al., 2017, MELOTTO et al., 2019). As sementes de cedro rosa (Safrá de 2018; val:12/2019) e da alface var. cinderela (Lote: 0077301610000220; val:11/2020) foram adquiridas comercialmente.

### **2.2. Local de estudo**

O estudo foi conduzido no LASEF - Laboratório de Sementes e Ecofisiologia Florestal, no Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Goiabeiras, Vitória – ES e no Laboratório de Química, Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Campus Vila Velha, ES.



Fonte: superior - Google Maps; inferior - autora

Figura 2 – Local de coleta, no município de Aracruz – ES. Abaixo interior da plantação clonal de *E. urograndis*, Área 27 – Talhão 5.

### 2.3. Preparação dos extratos

As folhas coletadas foram submetidas a secagem em estufa de circulação forçada a 55°C por 72 horas. Após seco, o material foi pesado, foi macerado, separadamente, por turbulização com etanol comercial na proporção de 1:10 (folhas: etanol). Após 72 horas, o material foi filtrado, separando o resíduo vegetal do extrato. O extrato etanólico obtido após filtração foi concentrado em evaporador rotatório até a completa eliminação do etanol, que após recuperado foi novamente adicionado ao resíduo vegetal, para continuar o processo de extração por mais 72 horas, que se repetiu até o esgotamento do material vegetal. Os extratos brutos obtido foram armazenados em frascos de vidro sob refrigeração. Parte do extrato etanólico concentrado, obtido após o processo de extração, foi ressuspenso em uma mistura de água:etanol (2:8) e realizadas extrações sucessivas com solventes de polaridade crescente, conforme o esquema abaixo (Figura 3), obtendo as frações hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEtOH), butanol (BuOH) e aquosa (Aq) (Adaptado de GRISI et al., 2015).

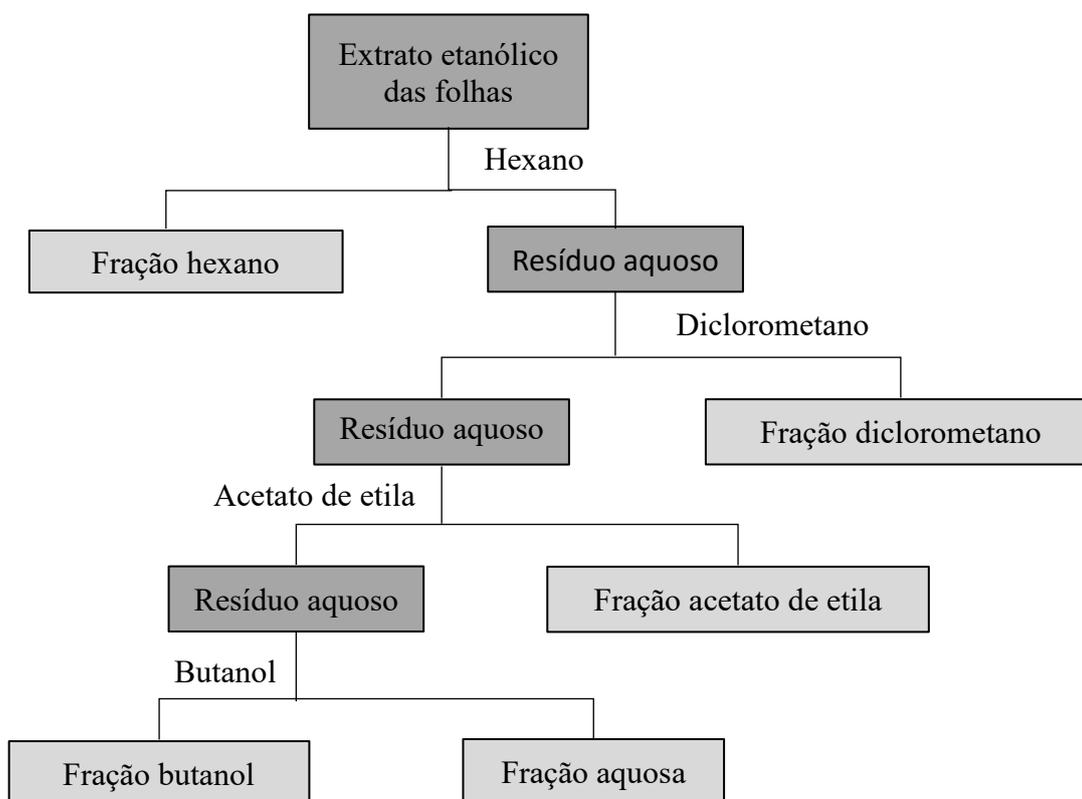


Figura 3 - Esquema de fracionamento dos extratos etanólicos de folhas maduras e serrapilheira de *Eucalyptus urograndis* (Adaptado de TANVEER et al., 2012).

Após o fracionamento, o solvente foi completamente eliminado pela evaporação em capela para as frações de Hex, DCM e AcEtOH, nas frações BuOH o butanol foi eliminado por meio de rotoevaporação e as frações Aq foram liofilizadas, obtendo-se as frações concentradas para os testes.

## 2.4. Bioensaio de germinação

A fim de avaliar a atividade alelopática dos extratos etanólicos e frações, foram realizados testes germinativos com as sementes de alface e cedro rosa. Os extratos etanólicos das folhas maduras e da serrapilheira foram diluídos em água destilada e as frações (Hex, DCM, AcEtOH, BuOH e Aq) foram solubilizados com auxílio de DMSO (dimetilsulfóxido), adicionando 5µL de DMSO/mL de solução, obtendo-se soluções nas concentrações de 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/mL e como controle negativos, água destilada e solução de DMSO a 0,5% (5µL/mL) em água destilada (GRISI et al, 2015; PEREIRA et al, 2018). Para a montagem do tratamento foi realizada a desinfestação superficial das sementes com hipoclorito de sódio 12% por 15 minutos. Em cada tratamento foram utilizadas 100 aquênios de alface e 100 sementes de cedro rosa em 5 repetições de 20 aquênios ou sementes cada, respectivamente, colocadas para germinar em placas de petri de 7cm de diâmetro, com folha dupla de papel filtro embebidas com 3 mL de extratos e 3 mL de água destilada ou solução de DMSO 0,5%, para os controles negativos.

As placas foram mantidas em câmara de germinação (BOD) em luz constante a 20°C para alface (NASCIMENTO et al, 2012) e a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h para cedro rosa (SANTOS et al, 2015).

O critério de germinação utilizado foi a protrusão da radícula com 1mm de comprimento (BEWLEY; BLACK, 1994). A contagem de germinação ocorreu a cada 24h, durante 7 dias, para *L. sativa* e 21 dias para *C. fissilis*. Posteriormente foram avaliados: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e crescimento inicial.

### 2.4.1. Porcentagem de germinação (G)

A porcentagem de germinação foi obtida pela seguinte fórmula:

$$G = \left( \frac{N}{A} \right) \times 100$$

Sendo: N = total de sementes germinadas; A = total de sementes (LABOURIAU; VALADARES, 1976).

#### 2.4.2. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) será calculado pela fórmula (MAGUIRE, 1962; KRZYZANOWSKI et al, 1999):

$$IVG = \left(\frac{G1}{N1}\right) + \left(\frac{G2}{N2}\right) + \dots \left(\frac{Gn}{Nn}\right)$$

Onde: G1 = sementes germinadas na primeira contagem; N1 = dias decorridos até a primeira contagem; G2 = sementes germinadas na segunda contagem; N2 = dias decorridos até a segunda contagem; Gn = sementes germinadas na última contagem e Nn = dias decorridos até a última contagem.

#### 2.4.3. Avaliação do crescimento inicial

Para analisar o crescimento inicial das plântulas germinadas, o comprimento, a massa fresca e seca da radícula e parte aérea foram medidos ao final do bioensaio de germinação. O comprimento da radícula (CR) e da parte aérea (CPA) foi medido com auxílio de paquímetro e expressos em centímetros por plântula (cm/pl.). Após a medição a radícula e parte aérea foram pesadas obtendo-se a massa fresca da radícula (MFR) e a massa fresca da parte aérea (MFPA). As amostras foram levadas a estufa a 60°C por 72hs e em sequência pesadas novamente, para a obtenção da massa seca da radícula (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA). A massa foi pesada em balança analítica e expressa em miligramas por plântula (mg/pl.) (NAKAGAWA, 1999).

Esta análise consiste em verificar se as plântulas germinadas apresentam crescimento inicial normal, quando comparadas com o controle, e como os extratos e frações testados interferem no desenvolvimento inicial das plântulas de *L. sativa* e *C. fissilis*.

### 2.5. Potencial osmótico e pH

O potencial osmótico, bem como o pH das soluções usados na germinação de sementes podem influenciar nos resultados observados (VILLELA et al., 1991; DIAS et al., 2016).

Para avaliar seu efeito na germinação das sementes, o potencial osmótico dos extratos e frações nas concentrações utilizadas foram medidos através do potenciômetro WP4 e os valores expressos em MPa (DELGADO; BARBEDO, 2012). Utilizando Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) foram preparadas soluções com os mesmos valores obtidos para verificar o efeito do potencial osmótico dos extratos e frações sobre a germinação e crescimento (VILLELA et al, 1991).

O pH dos extratos e frações em suas diferentes concentrações foi aferido por meio de pHmetro (AK95, AKSO). Preparou-se soluções com o mesmo pH das soluções utilizadas no Bioensaio de germinação, utilizando solução de HCl 0,05M e NaOH 0,05M. As sementes foram submetidas aos mesmos valores de pH dos extratos e frações testados, a fim de se observar a interferência dessa variável na germinação das sementes.

## **2.6. Análise fitoquímica**

A análise química das folhas de *Eucalyptus urograndis* visa identificar os principais grupos do metabólito secundário por cromatografia de camada delgada (CCD), para avaliar a presença de alcalóides, derivados de antraceno, cumarinas, lignanas, mono e diterpenos, naftoquinonas, triterpenos e esteroides (Conforme tabela 1). Utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, 10 x 10 cm, com bandas de aplicação de 0,5 cm para as amostras e eluição da fase móvel de 8,0cm. Com auxílio de uma micropipeta Hamilton 705SN de 50µL, foram aplicados 10µL das amostras. O revelador para os grupos das lignanas, mono e diterpenos foi a vanilina sulfúrica (1% de Vanilina e 10% de Ácido Sulfúrico concentrado). Após a revelação, as placas foram aquecidas a 105°C por 10 minutos até o aparecimento das manchas (WAGNER; BLADT, 1996). Para a revelação da placa de identificação de derivados de cumarina, antracenos e naftoquinonas preparou-se uma solução etanólica de KOH a 10% (m/v). Para alcalóides, foi utilizado o seguinte procedimento: Solução (a): dissolver 85g de nitrato de bismuto em 10ml de ácido acético glacial e 40ml de água, filtrou-se. Solução (b) Dissolver 8g de KI em 30ml de água. Solução estoque: (a) + (b) misturados 1:1. Para revelar, 1ml da solução estoque com 2ml de ácido acético glacial e 10ml de água. Na revelação dos triterpenos e esteróides foi preparado uma solução de 5ml de ácido acético e 5ml de ácido sulfúrico concentrado, adicionado cuidadosamente a 50ml de etanol em banho de gelo. em seguida aqueceu-se a 100°C em uma chapa aquecedora.

Tabela 1 - Cromatografia em camada delgada (CCD), sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos fitoquímicos.

<b>Fitoquímico</b>	<b>Sistema de eluição</b>	<b>Reagente</b>
Alcalóides	Tolueno: Acetato de etila: dietilamina (70:20:10, v/v)	Dragendorff
Derivados de Antraceno	Acetato de etila: metanol: água (1000:13:5:10, v/v)	10% de KOH em etanol
Cumarinas	Tolueno: Éter etílico: (1:1 saturado com ácido acético 10%, v/v)	10% de KOH em etanol
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4, v/v)	Vanilina sulfúrica
Mono e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7, v/v)	Vanilina sulfúrica
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1, v/v)	10% de KOH em etanol
Triterpenos e esteróides	Tolueno: clorofórmio:etanol (40:40:10, v/v)	Liebermann-Burchard
Flavanóides e taninos	Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10, v/v)	NP/PEG

### **Cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)**

Para caracterização química do extrato etanólico e das frações apolares foram realizadas análises por um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas da Agilent (7890 B) e detector de massa modelo 5977A MSD com impacto de elétrons de 70eV. Foi utilizado uma coluna HP-5 de 30 m x 250 µm x 0,25 µm para realizar o processo de separação. O injetor foi ajustado para uma temperatura de 290°C e o detector para 310 °C. O sistema de eluição foi em uma rampa de aquecimento iniciando a 40 °C com taxa de aquecimento de 5°C/min até 280 °C, seguido com taxa de aquecimento de 15°C/min até 310°C. Para caracterização dos compostos químicos foi utilizado padrão de alcano de C10 a C40 para a cálculo do índice de Kovats (IK). A identificação das substâncias foi através da comparação dos espectros de massas da biblioteca NIST com os índices de retenção e semelhança dos espectros de massas com dados da literatura (Adams, 2009; The Pherobase-Database, 2018; Chemistry WebBook, 2018).

## 2.7. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi em esquema fatorial 6 x 5 x 2, com 6 tipos de amostras (extrato bruto e frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquosa), 5 tratamentos (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL) e 2 tipos de material vegetal (folhas maduras e folhas da serrapilheira).

Cada tratamento foi composto por 5 repetições de 20 sementes. Os dados obtidos no bioensaio de germinação e crescimento inicial foram submetidos à análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio da ferramenta de comparações múltiplas (bootstrap), comparando as médias por extrato e fração e por concentração.

As análises foram realizadas no programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Extração e fracionamento

Com a extração etanólica obteve-se 82,6g e 116,87g de extrato bruto de folhas maduras e de serrapilheira, respectivamente (Tabela 2). As folhas maduras apresentaram um maior rendimento (31,4%) em relação ao peso seco de folhas que foram submetidas a extração. Aproximadamente 25% do extrato bruto obtido foi armazenado para realização do bioensaio de germinação e análises químicas.

Tabela 2 - Rendimento da extração com etanol das folhas maduras e da serrapilheira de *Eucalyptus urograndis*.

	Folhas maduras	Serrapilheira
<b>Peso seco folhas</b>	262,88g	537,04g
<b>Extrato Bruto</b>	82,6g	116,87g
<b>Rendimento</b>	31,4%	21,76%
<b>Armazenado</b>	19,9g	30,93g
<b>Fracionado</b>	62,7g	85,94g

O peso de extrato bruto fracionado foi de 62,7g para as folhas maduras e 85,94g para a serrapilheira (Tabela 2). Após o fracionamento com solventes de polaridades diferentes, os extratos com maior rendimento foram os extratos de Hex e DCM, de ambos os tipos foliares (Tabela 3). As demais frações, com maiores polaridades, tiveram baixo rendimento. As frações apresentaram rendimento muito semelhante para as folhas maduras e serrapilheira.

Tabela 3 – Rendimento do fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas maduras e da serrapilheira de *Eucalyptus urograndis*. Seguindo a ordem crescente de polaridade.

Fração	Folhas maduras		Serrapilheira	
	Peso*	Rendimento	Peso*	Rendimento
Hex	15,46g	24,65%	19,82g	23,06%
DCM	10,19g	16,25%	16,61g	19,32%
AcEtOH	1,67g	2,66%	2,96g	3,44%
BuOH	1,31g	2,09%	2,81g	3,27%
Aq	1,7g	2,71%	2,38g	2,76%

\* Peso obtido das frações após a completa eliminação de solventes e água.

### 3.2. Bioensaio germinativo

Ambos os controles negativos, água destilada e DMSO a 0,5%, apresentaram os mesmos valores para os parâmetros analisados, não havendo diferença estatística entre eles. Demonstrando que o DMSO não tem efeito sobre os resultados observados e, portanto, nas tabelas a seguir constará apenas um controle.

O bioensaio de germinação evidenciou a influência negativa que os extratos brutos e algumas frações podem exercer sobre a germinação das sementes de alface (Tabela 4) e cedro rosa (Tabela 5). Em ambas as espécies receptoras a fração que provocou a maior inibição na porcentagem de germinação foi a DCM, em todas as concentrações testadas.

Para alface (Tabela 4), o extrato bruto e a fração Hex, de ambos os tipos foliares, interferiram negativamente na porcentagem de germinação, sendo seu efeito negativo proporcional a concentração e maior para a serrapilheira. As frações AcEtOH folhas maduras e BuOH serrapilheira afetaram a germinação de alface apenas na concentração 10mg/mL. As frações, BuOH e Aq das folhas maduras e AcEtOH e Aq da serrapilheira, não exerceram influência sobre essa variável.

Tabela 4 – Porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de *Lactuca sativa*, submetida a extratos etanólicos e suas frações de *Eucalyptus urograndis*.

Concentração	Folha	Amostras	%G	IVG			
1,25 mg/mL		Controle	98,0 A	23,17 A			
		Madura	Bruto	95,0 A	21,75 A		
			Hex	98,0 A	20,02 C		
			DCM	53,0 D	3,85 F		
			AcEtOH	97,0 A	21,00 B		
			BuOH	99,0 A	23,00 A		
			Aq	98,0 A	21,75 A		
		Serrapilheira	Bruto	100,0 A	15,71 D		
			Hex	97,0 A	22,02 A		
			DCM	21,0 E	1,27 H		
			AcEtOH	100,0 A	19,92 C		
			BuOH	99,0 A	19,75 C		
			Aq	98,0 A	19,71 C		
		2,5 mg/mL		Madura	Bruto	95,0 A	17,54 C
Hex	87,0 B				11,88 D		
DCM	29,0 E				2,14 G		
AcEtOH	96,0 A				19,5 C		
BuOH	97,0 A				20,29 B		
Aq	98,0 A				20,63 B		
Serrapilheira	Bruto			97,0 A	11,88 C		
	Hex			99,0 A	19,49 C		
	DCM			18,0 E	1,57 H		
	AcEtOH			99,0 A	17,33 C		
	BuOH			96,0 A	17,42 C		
	Aq			99,0 A	16,46 D		
5 mg/mL				Madura	Bruto	79,0 C	10,53 D
					Hex	76,5 C	6,58 E
		DCM	28,0 E		1,50 H		
		AcEtOH	98,0 A		17,25 C		
		BuOH	100,0 A		18,96 C		
		Aq	100,0 A		14,63 D		
		Serrapilheira	Bruto	72,0 C	7,52 E		
			Hex	58,0 D	6,04 E		
			DCM	10,0 F	0,62 I		
			AcEtOH	98,0 A	15,64 D		
			BuOH	96,0 A	11,00 D		
			Aq	98,0 A	13,81 D		
		10 mg/mL		Madura	Bruto	66,0 C	5,86 E
					Hex	21,0 E	2,00 G
DCM	12,0 F				0,75 I		
AcEtOH	93,0 B				14,46 D		
BuOH	97,0 A				18,36 C		
Aq	100,0 A				13,11 D		
Serrapilheira	Bruto			44,0 D	2,59 G		
	Hex			7,0 F	0,81 I		
	DCM			1,0 G	0,08 I		
	AcEtOH			98,0 A	13,48 D		
	BuOH			76,0 C	7,50 E		
	Aq			100,0 A	12,29 D		

Média seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

A germinação das sementes de alface, nas condições ideais (controle), ocorreu nas primeiras 24 horas de experimento, alcançando 98% de germinação. O IVG foi proporcionalmente afetado, sendo os menores valores observados na maior concentração (Tabela 4). O tipo foliar afetou de forma diferente o IVG, os extratos e frações da serrapilheira reduziram a velocidade de germinação de forma mais pronunciada, mesmo na concentração de 1,25mg/mL as médias foram menores em relação ao controle, exceto para a fração HEX serrapilheira. O extrato bruto, de ambos tipos foliares, afetaram o IVG negativamente, com efeito mais evidente na maior concentração, além disso as sementes tratadas com extrato de serrapilheira apresentaram menores médias.

A germinação das sementes de cedro rosa (Tabela 5) foi mais afetada que a germinação de alface, em que todos os extratos e frações provocaram inibição da %G de forma proporcional a concentração. A fração DCM causou uma redução na germinação de quase 50% na concentração de 1,25 mg/mL. O extrato bruto e a fração BuOH das folhas maduras e as frações Hex e Aq da serrapilheira, junto com a fração DCM, afetaram negativamente a germinação em todas as concentrações testadas. O extrato bruto, frações acetato de etila e butanol da serrapilheira e frações Hex, AcEtOH e Aq das folhas maduras, não reduziram a %G na concentração 1,25 mg/mL. De maneira geral para o cedro rosa e alface o tipo de foliar não teve grande influência nos resultados.

A germinação do cedro rosa teve início no 6º dia de tratamento para o controle e no 7º dia para as demais frações. A maior concentração testada, 10 mg/mL, reduziu o IVG do cedro rosa (Tabela 5). O IVG das sementes do cedro rosa foi reduzido a partir de 1,25 mg/mL na fração DCM. O extrato bruto e Aq, de ambos tipos foliares e frações Hex folhas maduras, afetaram negativamente o IVG a partir da 2,5 mg/mL. Apenas a partir de 5 mg/mL as frações AcEtOH folhas maduras, Hex de serrapilheira e BuOH, dos dois tipos foliares, reduziram o IVG. A fração acetato de etila serrapilheira, só afetou na maior concentração.

Os extratos e frações testadas, provocaram um atraso na germinação das sementes das duas espécies. A fração DCM, foi a fração de teve maior impacto no IVG de alface (Tabela 4) e cedro rosa (Tabela 5), apresentando os menores valores entres os extratos e frações testadas.

Tabela 5 – Porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de *Cedrela fissilis*, submetida a extratos etanólicos e suas frações de *Eucalyptus urograndis*.

Concentração	Folha	Amostras	%G	IVG			
1,25 mg/mL	Madura	Controle	100	A	1,914	A	
		Bruto	78,57	B	1,724	A	
		Hex	82,14	A	1,622	A	
		DCM	53,57	C	1,218	C	
		AcEtOH	92,85	A	1,670	A	
		BuOH	78,57	B	1,860	A	
		Aq	88,09	A	1,656	A	
	Serrapilheira	Bruto	86,90	A	1,672	A	
		Hex	71,42	B	1,742	A	
		DCM	51,19	C	1,224	C	
		AcEtOH	85,71	A	1,610	A	
		BuOH	86,90	A	1,832	A	
		Aq	73,80	B	1,596	A	
		2,5 mg/mL	Madura	Bruto	71,42	B	1,450
Hex	77,38			B	1,528	B	
DCM	58,33			C	1,160	C	
AcEtOH	85,71			A	1,578	A	
BuOH	70,23			B	1,630	A	
Aq	70,23			B	1,388	B	
Serrapilheira	Bruto			77,38	B	1,382	B
	Hex		79,76	B	1,636	A	
	DCM		48,80	C	1,184	C	
	AcEtOH		65,47	B	1,588	A	
	BuOH		79,76	B	1,642	A	
	Aq		69,04	B	1,348	B	
	5 mg/mL		Madura	Bruto	61,90	C	1,318
Hex				73,80	B	1,180	C
DCM		40,47		D	1,076	C	
AcEtOH		78,57		B	1,524	B	
BuOH		74,28		B	1,492	B	
Aq		62,06		C	1,144	C	
Serrapilheira		Bruto		72,61	B	1,272	C
		Hex	82,14	B	1,398	B	
		DCM	49,52	C	1,028	C	
		AcEtOH	75,0	B	1,567	A	
		BuOH	70,23	B	1,460	B	
		Aq	61,90	C	1,124	C	
		10 mg/mL	Madura	Bruto	60,95	C	1,334
Hex				76,19	B	1,154	C
DCM	16,19			D	0,358	D	
AcEtOH	58,09			C	1,416	C	
BuOH	70,47			B	1,530	B	
Aq	75,0			B	1,084	C	
Serrapilheira	Bruto			76,19	B	1,326	C
	Hex		79,76	B	1,100	C	
	DCM		38,09	D	0,606	D	
	AcEtOH		59,04	C	1,502	B	
	BuOH		69,04	B	1,432	B	
	Aq		54,76	C	1,088	C	

Média seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

### 3.3. Crescimento inicial

De forma semelhante aos resultados de germinação, os controles negativos, também foram unificados nas tabelas a seguir, por não apresentarem diferenças estatísticas. O comprimento da parte aérea (CPA) apresentou os menores valores quando expostas aos extratos e frações na concentração de 10mg/mL (Tabela 8). A fração DCM causou maior inibição do crescimento da parte aérea de alface, não diferindo quanto ao tipo foliar. O extrato bruto de folhas maduras reduziu o CPA apenas nas concentrações de 5 e 10 mg/mL, o extrato bruto serrapilheira afetou a CPA em todas as concentrações. As frações Hex e AcEtOH, reduziu gradativamente a CPA com o aumento de concentração, havendo diferença significativas entres os tipos foliares. A fração BuOH folhas maduras causou redução da CPA apenas na maior concentração testada, enquanto a fração butanol de serrapilheira provocou maior redução, tendo a média igual ao controle apenas na concentração de 1,25 mg/mL. A fração aquosa de folhas maduras estimulou um aumento significativo no CPA, maior que o controle nas concentrações de 1,25 e 2,5 mg/mL, efeito que não foi observado em Aq serrapilheira.

Todos os tratamentos influenciaram o comprimento da radícula (CR) de alface (Tabela 6), no entanto a fração DCM reduziu aproximadamente 50% do CR na menor concentração testada, sendo a fração com maior atividade inibitória do crescimento radicular. Para os demais tratamentos a maior redução foi observada na maior concentração testada. Na concentração de 10 mg/mL houve escurecimento do ápice das radículas de alface. Os tratamentos Aq folhas maduras e o extrato bruto serrapilheira na concentração de 1,25 mg/mL estimularam o crescimento radicular. A fração AcEtOH teve resultados semelhantes para os tipos foliares, afetando em todas as concentrações. As frações BUOH e AQ, apresentaram diferença significativa quanto ao tipo foliar, com menores medias para serrapilheira.

A MFPA de alface foi reduzida em todos os extratos e frações testados nas concentrações de 5 e 10 mg/mL (Tabela 6) e na maior concentração a fração DCM foi a mais ativa. O extrato bruto e fração Aq das folhas maduras, a fração BuOH e Aq da serrapilheira afetaram a MFPA a partir de 5 mg/mL. O extrato bruto serrapilheira e as demais frações, influenciaram negativamente a MFPA em todas as concentrações testadas.

Tabela 6 – Crescimento inicial de *Lactuca sativa*. Comprimento da parte aérea (CPA) e da radícula (CR) em cm/plântula, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da radícula (MFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) e da radícula (MSR) em mg/plântula.

Concentração	Folha	Amostras	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
1,25 mg/mL	Madura	Controle	0,62 <sup>B</sup>	6,38 <sup>B</sup>	4,958 <sup>A</sup>	5,310 <sup>B</sup>	0,360 <sup>C</sup>	0,303 <sup>A</sup>
		Bruto	0,61 <sup>B</sup>	5,55 <sup>C</sup>	4,878 <sup>A</sup>	4,703 <sup>C</sup>	0,350 <sup>C</sup>	0,290 <sup>A</sup>
		Hex	0,53 <sup>C</sup>	5,99 <sup>C</sup>	3,515 <sup>C</sup>	4,100 <sup>D</sup>	0,330 <sup>C</sup>	0,245 <sup>A</sup>
		DCM	0,37 <sup>E</sup>	3,09 <sup>E</sup>	3,128 <sup>C</sup>	2,650 <sup>E</sup>	0,358 <sup>C</sup>	0,260 <sup>A</sup>
		AcEtOH	0,61 <sup>B</sup>	5,37 <sup>C</sup>	4,010 <sup>B</sup>	5,255 <sup>B</sup>	0,313 <sup>C</sup>	0,325 <sup>A</sup>
		BuOH	0,62 <sup>B</sup>	6,26 <sup>B</sup>	3,713 <sup>C</sup>	4,540 <sup>C</sup>	0,353 <sup>C</sup>	0,335 <sup>A</sup>
		Aq	0,71 <sup>A</sup>	6,90 <sup>A</sup>	4,855 <sup>A</sup>	5,720 <sup>A</sup>	0,338 <sup>C</sup>	0,323 <sup>A</sup>
	Serrapilheira	Bruto	0,56 <sup>C</sup>	7,27 <sup>A</sup>	4,198 <sup>B</sup>	4,915 <sup>C</sup>	0,328 <sup>C</sup>	0,318 <sup>A</sup>
		Hex	0,56 <sup>C</sup>	6,39 <sup>B</sup>	4,223 <sup>B</sup>	4,603 <sup>C</sup>	0,395 <sup>B</sup>	0,320 <sup>A</sup>
		DCM	0,42 <sup>E</sup>	3,25 <sup>E</sup>	3,180 <sup>C</sup>	2,920 <sup>D</sup>	0,318 <sup>C</sup>	0,313 <sup>A</sup>
		AcEtOH	0,53 <sup>C</sup>	5,75 <sup>C</sup>	3,630 <sup>C</sup>	5,000 <sup>C</sup>	0,325 <sup>C</sup>	0,318 <sup>A</sup>
		BuOH	0,61 <sup>B</sup>	5,48 <sup>C</sup>	5,100 <sup>A</sup>	5,475 <sup>A</sup>	0,370 <sup>C</sup>	0,335 <sup>A</sup>
		Aq	0,61 <sup>B</sup>	6,17 <sup>B</sup>	4,640 <sup>A</sup>	4,800 <sup>C</sup>	0,373 <sup>C</sup>	0,288 <sup>A</sup>
		Bruto	0,60 <sup>B</sup>	5,50 <sup>C</sup>	4,755 <sup>A</sup>	4,248 <sup>D</sup>	0,365 <sup>C</sup>	0,285 <sup>A</sup>
2,5 mg/mL	Madura	Hex	0,46 <sup>D</sup>	4,52 <sup>D</sup>	3,070 <sup>C</sup>	3,043 <sup>D</sup>	0,363 <sup>C</sup>	0,223 <sup>A</sup>
		DCM	0,37 <sup>E</sup>	2,34 <sup>E</sup>	1,608 <sup>D</sup>	0,893 <sup>G</sup>	0,325 <sup>C</sup>	0,183 <sup>B</sup>
		AcEtOH	0,52 <sup>C</sup>	4,47 <sup>D</sup>	2,988 <sup>C</sup>	4,138 <sup>D</sup>	0,315 <sup>C</sup>	0,263 <sup>A</sup>
		BuOH	0,64 <sup>B</sup>	5,52 <sup>C</sup>	3,348 <sup>C</sup>	3,798 <sup>D</sup>	0,360 <sup>C</sup>	0,320 <sup>A</sup>
		Aq	0,69 <sup>A</sup>	5,99 <sup>C</sup>	4,845 <sup>A</sup>	5,133 <sup>B</sup>	0,325 <sup>C</sup>	0,298 <sup>A</sup>
		Bruto	0,48 <sup>D</sup>	5,69 <sup>C</sup>	3,623 <sup>C</sup>	3,708 <sup>D</sup>	0,283 <sup>C</sup>	0,223 <sup>A</sup>
		Hex	0,50 <sup>D</sup>	4,70 <sup>D</sup>	3,670 <sup>C</sup>	4,630 <sup>C</sup>	0,390 <sup>C</sup>	0,303 <sup>A</sup>
	Serrapilheira	DCM	0,40 <sup>E</sup>	2,93 <sup>E</sup>	2,248 <sup>D</sup>	2,145 <sup>E</sup>	0,350 <sup>C</sup>	0,275 <sup>A</sup>
		AcEtOH	0,48 <sup>D</sup>	2,80 <sup>E</sup>	2,923 <sup>C</sup>	3,620 <sup>D</sup>	0,268 <sup>C</sup>	0,278 <sup>A</sup>
		BuOH	0,52 <sup>C</sup>	3,68 <sup>D</sup>	4,710 <sup>A</sup>	5,295 <sup>B</sup>	0,383 <sup>C</sup>	0,335 <sup>A</sup>
		Aq	0,60 <sup>B</sup>	3,53 <sup>D</sup>	4,583 <sup>A</sup>	3,170 <sup>D</sup>	0,430 <sup>B</sup>	0,223 <sup>A</sup>
		Bruto	0,46 <sup>D</sup>	2,21 <sup>E</sup>	3,715 <sup>C</sup>	3,945 <sup>D</sup>	0,363 <sup>C</sup>	0,278 <sup>A</sup>
		Hex	0,41 <sup>E</sup>	3,51 <sup>D</sup>	2,585 <sup>D</sup>	2,510 <sup>E</sup>	0,390 <sup>C</sup>	0,238 <sup>A</sup>
		DCM	0,25 <sup>E</sup>	0,25 <sup>E</sup>	1,728 <sup>D</sup>	0,563 <sup>G</sup>	0,480 <sup>A</sup>	0,168 <sup>B</sup>
5 mg/mL	Madura	AcEtOH	0,51 <sup>D</sup>	1,81 <sup>E</sup>	2,375 <sup>D</sup>	1,733 <sup>F</sup>	0,343 <sup>C</sup>	0,178 <sup>B</sup>
		BuOH	0,62 <sup>B</sup>	4,17 <sup>D</sup>	3,525 <sup>C</sup>	3,693 <sup>D</sup>	0,403 <sup>B</sup>	0,286 <sup>A</sup>
		Aq	0,50 <sup>D</sup>	3,56 <sup>D</sup>	4,078 <sup>B</sup>	4,540 <sup>C</sup>	0,365 <sup>C</sup>	0,300 <sup>A</sup>
		Bruto	0,40 <sup>E</sup>	1,69 <sup>E</sup>	3,130 <sup>C</sup>	2,070 <sup>E</sup>	0,370 <sup>C</sup>	0,183 <sup>B</sup>
		Hex	0,40 <sup>E</sup>	3,47 <sup>D</sup>	2,890 <sup>C</sup>	3,058 <sup>D</sup>	0,388 <sup>C</sup>	0,233 <sup>A</sup>
		DCM	0,28 <sup>E</sup>	0,82 <sup>E</sup>	3,163 <sup>C</sup>	2,133 <sup>E</sup>	0,463 <sup>A</sup>	0,230 <sup>A</sup>
		AcEtOH	0,41 <sup>E</sup>	2,21 <sup>E</sup>	2,925 <sup>C</sup>	2,223 <sup>E</sup>	0,380 <sup>C</sup>	0,225 <sup>A</sup>
	Serrapilheira	BuOH	0,42 <sup>E</sup>	1,25 <sup>E</sup>	4,203 <sup>B</sup>	3,060 <sup>D</sup>	0,418 <sup>B</sup>	0,253 <sup>A</sup>
		Aq	0,54 <sup>C</sup>	0,72 <sup>E</sup>	3,390 <sup>D</sup>	1,613 <sup>F</sup>	0,518 <sup>A</sup>	0,160 <sup>B</sup>
		Bruto	0,34 <sup>E</sup>	0,55 <sup>E</sup>	3,085 <sup>C</sup>	0,753 <sup>G</sup>	0,435 <sup>B</sup>	0,108 <sup>B</sup>
		Hex	0,28 <sup>E</sup>	0,93 <sup>E</sup>	1,735 <sup>D</sup>	0,803 <sup>G</sup>	0,460 <sup>A</sup>	0,153 <sup>B</sup>
		DCM	0,00 <sup>F</sup>	0,10 <sup>E</sup>	0,000 <sup>E</sup>	0,400 <sup>H</sup>	0,000 <sup>D</sup>	0,130 <sup>B</sup>
		AcEtOH	0,43 <sup>E</sup>	0,46 <sup>E</sup>	2,140 <sup>D</sup>	1,050 <sup>G</sup>	0,405 <sup>B</sup>	0,115 <sup>B</sup>
		BuOH	0,53 <sup>C</sup>	2,28 <sup>E</sup>	2,630 <sup>D</sup>	1,365 <sup>F</sup>	0,473 <sup>A</sup>	0,158 <sup>B</sup>
10 mg/mL	Madura	Aq	0,50 <sup>D</sup>	1,70 <sup>E</sup>	3,083 <sup>C</sup>	1,910 <sup>F</sup>	0,468 <sup>A</sup>	0,138 <sup>B</sup>
		Bruto	0,29 <sup>E</sup>	0,25 <sup>E</sup>	2,138 <sup>D</sup>	0,593 <sup>G</sup>	0,410 <sup>B</sup>	0,123 <sup>B</sup>
		Hex	0,25 <sup>E</sup>	1,16 <sup>E</sup>	2,430 <sup>D</sup>	1,458 <sup>F</sup>	0,420 <sup>B</sup>	0,175 <sup>B</sup>
		DCM	0,10 <sup>F</sup>	0,05 <sup>E</sup>	0,000 <sup>E</sup>	0,000 <sup>I</sup>	0,000 <sup>D</sup>	0,000 <sup>C</sup>
		AcEtOH	0,43 <sup>E</sup>	0,29 <sup>E</sup>	2,650 <sup>D</sup>	1,370 <sup>F</sup>	0,408 <sup>B</sup>	0,158 <sup>B</sup>
		BuOH	0,42 <sup>E</sup>	0,49 <sup>E</sup>	3,153 <sup>C</sup>	1,865 <sup>F</sup>	0,425 <sup>B</sup>	0,185 <sup>B</sup>
		Aq	0,39 <sup>E</sup>	0,34 <sup>E</sup>	2,508 <sup>D</sup>	0,648 <sup>G</sup>	0,468 <sup>A</sup>	0,095 <sup>B</sup>

Média seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Os tratamentos reduziram significativamente a MFR de alface (Tabela 6), principalmente nas maiores concentrações, havendo uma relação diretamente proporcional em relação a concentração testada. Entre os tratamentos, a fração de DCM foi a que mais afetou a MFR. A concentração de 10 mg/mL provocou uma redução acentuada da MFR. Os extratos brutos afetaram a MFR em todas as concentrações. As frações Aq folhas maduras e BuOH serrapilheira provocaram um aumento significativo na massa, com médias maiores que o controle quando submetidos a menor concentração testada.

A massa seca da parte aérea de alface (Tabela 6) apresentou as maiores médias na concentração de 10 mg/mL, exceto a fração DCM que não apresentou massa significativa (não detectada na balança). De modo geral, os resultados observados não diferiram significativa em relação ao extrato, fração ou tipo foliar.

A massa seca da radícula de alface (Tabela 6) foi pouco reduzida quando tratadas com os extratos e frações na maior concentração. Todos os tratamentos apresentaram média semelhante ao controle na menor concentração. A fração DCM de folhas maduras, afetou a massa nas maiores concentração, diferindo da DCM de serrapilheira, que apresentou, em 10 mg/mL, massa não detectada pela balança. O tipo foliar não teve influência sobre os resultados de MSR.

O comprimento da parte aérea (CPA) de cedro rosa (Tabela 7) foi pouco influenciada pelos tratamentos, apenas a fração DCM, de ambos tipos foliares, e a fração butanol de folhas maduras provocaram reduções significativas.

O comprimento da radícula de cedro rosa (Tabela 7), foi afetada pela maioria dos tratamentos, no entanto a fração diclorometano da serrapilheira inibiu o crescimento de maneira mais pronunciada. Na maior concentração testada houve redução do CR para todos extratos e frações, o mesmo ocorreu na concentração de 5 mg/mL, exceto para Hex serrapilheira. O extrato bruto e a fração Hex da serrapilheira e a fração acetato de etila de folhas maduras estimularam o crescimento radicular na menor concentração.

A massa fresca da parte aérea (MFPA) de *C. fissilis* (Tabela 7), foi mais afetada na maior concentração testada. A fração butanol das folhas maduras provocou redução de MFPA até na concentração de 1,25 mg/mL, sendo a mais ativa. A fração de acetato de etila e AQ não influenciaram essa variável e a maioria das frações só reduziram a MFPA nas maiores concentrações testadas.

Tabela 7 – Crescimento inicial de *Cedrela fissilis*. Comprimento da parte aérea (CPA) e da radícula (CR) em cm/plântula, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da radícula (MFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) e da radícula (MSR) em mg/plântula.

Concentração	Folha	Amostras	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR	
1,25 mg/mL	Madura	Controle	5,994 <sup>A</sup>	3,788 <sup>B</sup>	128,120 <sup>A</sup>	36,148 <sup>A</sup>	14,558 <sup>A</sup>	3,300 <sup>A</sup>	
		Bruto	5,406 <sup>A</sup>	3,092 <sup>C</sup>	104,738 <sup>A</sup>	27,280 <sup>A</sup>	13,160 <sup>A</sup>	2,672 <sup>B</sup>	
		Hex	5,400 <sup>A</sup>	3,942 <sup>B</sup>	95,334 <sup>A</sup>	24,770 <sup>A</sup>	13,380 <sup>A</sup>	2,280 <sup>B</sup>	
		DCM	4,062 <sup>B</sup>	3,000 <sup>C</sup>	90,922 <sup>A</sup>	23,128 <sup>A</sup>	13,448 <sup>A</sup>	2,008 <sup>C</sup>	
		AcEtOH	5,624 <sup>A</sup>	4,418 <sup>A</sup>	110,618 <sup>A</sup>	34,198 <sup>A</sup>	13,656 <sup>A</sup>	3,424 <sup>A</sup>	
		BuOH	3,928 <sup>B</sup>	2,984 <sup>C</sup>	83,856 <sup>B</sup>	25,442 <sup>A</sup>	14,142 <sup>A</sup>	2,526 <sup>B</sup>	
		Aq	5,822 <sup>A</sup>	3,748 <sup>B</sup>	103,224 <sup>A</sup>	27,016 <sup>A</sup>	13,602 <sup>A</sup>	2,926 <sup>A</sup>	
	Serrapilheira	Bruto	5,342 <sup>A</sup>	4,154 <sup>A</sup>	95,014 <sup>A</sup>	15,530 <sup>B</sup>	12,756 <sup>A</sup>	2,290 <sup>B</sup>	
		Hex	5,432 <sup>A</sup>	4,280 <sup>A</sup>	110,00 <sup>A</sup>	26,122 <sup>A</sup>	12,106 <sup>A</sup>	1,898 <sup>C</sup>	
		DCM	3,864 <sup>B</sup>	2,792 <sup>D</sup>	91,754 <sup>A</sup>	23,278 <sup>A</sup>	12,506 <sup>A</sup>	1,884 <sup>C</sup>	
		AcEtOH	5,034 <sup>A</sup>	2,950 <sup>C</sup>	101,440 <sup>A</sup>	26,726 <sup>A</sup>	13,364 <sup>A</sup>	2,809 <sup>A</sup>	
		BuOH	4,710 <sup>A</sup>	3,386 <sup>C</sup>	96,394 <sup>A</sup>	30,720 <sup>A</sup>	13,172 <sup>A</sup>	2,948 <sup>A</sup>	
		Aq	5,316 <sup>A</sup>	3,278 <sup>C</sup>	97,940 <sup>A</sup>	24,032 <sup>A</sup>	12,338 <sup>A</sup>	2,316 <sup>B</sup>	
		2,5 mg/mL	Madura	Bruto	4,940 <sup>A</sup>	2,962 <sup>C</sup>	111,174 <sup>A</sup>	25,524 <sup>A</sup>	14,334 <sup>A</sup>
Hex	5,018 <sup>A</sup>			3,594 <sup>B</sup>	92,422 <sup>A</sup>	23,130 <sup>A</sup>	12,682 <sup>A</sup>	2,438 <sup>B</sup>	
DCM	3,514 <sup>B</sup>			2,688 <sup>D</sup>	82,140 <sup>B</sup>	21,784 <sup>B</sup>	12,916 <sup>A</sup>	1,880 <sup>C</sup>	
AcEtOH	4,892 <sup>A</sup>			2,632 <sup>D</sup>	101,368 <sup>A</sup>	26,930 <sup>A</sup>	13,050 <sup>A</sup>	2,240 <sup>B</sup>	
BuOH	3,924 <sup>B</sup>			2,270 <sup>D</sup>	83,694 <sup>B</sup>	21,564 <sup>B</sup>	14,658 <sup>A</sup>	2,470 <sup>B</sup>	
Aq	5,692 <sup>A</sup>			3,430 <sup>C</sup>	120,136 <sup>A</sup>	29,046 <sup>A</sup>	13,618 <sup>A</sup>	2,522 <sup>B</sup>	
Serrapilheira	Bruto			5,09 <sup>A</sup>	3,844 <sup>B</sup>	81,290 <sup>B</sup>	15,162 <sup>B</sup>	12,366 <sup>A</sup>	2,304 <sup>B</sup>
	Hex		5,136 <sup>A</sup>	3,806 <sup>B</sup>	95,872 <sup>A</sup>	25,316 <sup>A</sup>	11,584 <sup>A</sup>	1,954 <sup>C</sup>	
	DCM		3,618 <sup>B</sup>	2,586 <sup>D</sup>	80,526 <sup>B</sup>	20,118 <sup>B</sup>	13,658 <sup>A</sup>	1,752 <sup>C</sup>	
	AcEtOH		4,932 <sup>A</sup>	2,572 <sup>D</sup>	107,914 <sup>A</sup>	25,404 <sup>A</sup>	14,138 <sup>A</sup>	2,800 <sup>A</sup>	
	BuOH		3,824 <sup>B</sup>	2,862 <sup>D</sup>	91,232 <sup>A</sup>	24,894 <sup>A</sup>	13,220 <sup>A</sup>	2,462 <sup>B</sup>	
	Aq		5,506 <sup>A</sup>	3,018 <sup>C</sup>	99,232 <sup>A</sup>	22,334 <sup>B</sup>	13,880 <sup>A</sup>	2,268 <sup>B</sup>	
	5 mg/mL		Madura	Bruto	4,814 <sup>A</sup>	2,730 <sup>D</sup>	113,308 <sup>A</sup>	28,390 <sup>A</sup>	13,786 <sup>A</sup>
Hex				4,772 <sup>A</sup>	3,246 <sup>C</sup>	82,852 <sup>B</sup>	21,242 <sup>B</sup>	13,540 <sup>A</sup>	2,022 <sup>C</sup>
DCM		2,780 <sup>C</sup>		2,246 <sup>D</sup>	65,066 <sup>B</sup>	15,624 <sup>B</sup>	12,248 <sup>A</sup>	1,726 <sup>C</sup>	
AcEtOH		4,550 <sup>A</sup>		2,124 <sup>D</sup>	97,922 <sup>A</sup>	27,892 <sup>A</sup>	13,048 <sup>A</sup>	2,562 <sup>B</sup>	
BuOH		3,658 <sup>B</sup>		2,278 <sup>D</sup>	65,146 <sup>B</sup>	19,092 <sup>B</sup>	13,072 <sup>A</sup>	2,334 <sup>B</sup>	
Aq		5,430 <sup>A</sup>		3,314 <sup>C</sup>	108,390 <sup>A</sup>	28,060 <sup>A</sup>	13,820 <sup>A</sup>	2,686 <sup>B</sup>	
Serrapilheira		Bruto		4,544 <sup>A</sup>	3,526 <sup>C</sup>	83,496 <sup>B</sup>	19,006 <sup>B</sup>	13,110 <sup>A</sup>	2,060 <sup>C</sup>
		Hex	4,770 <sup>A</sup>	3,762 <sup>B</sup>	92,660 <sup>A</sup>	23,672 <sup>A</sup>	11,376 <sup>A</sup>	2,030 <sup>C</sup>	
		DCM	3,030 <sup>C</sup>	2,268 <sup>D</sup>	50,318 <sup>B</sup>	19,858 <sup>B</sup>	13,460 <sup>A</sup>	1,888 <sup>C</sup>	
		AcEtOH	4,820 <sup>A</sup>	2,518 <sup>D</sup>	96,732 <sup>A</sup>	22,998 <sup>A</sup>	13,626 <sup>A</sup>	3,18 <sup>A</sup>	
		BuOH	3,774 <sup>B</sup>	2,718 <sup>D</sup>	90,760 <sup>A</sup>	24,310 <sup>A</sup>	12,118 <sup>A</sup>	2,542 <sup>B</sup>	
		Aq	4,522 <sup>A</sup>	2,974 <sup>C</sup>	89,896 <sup>A</sup>	20,466 <sup>B</sup>	13,480 <sup>A</sup>	2,332 <sup>B</sup>	
		10 mg/mL	Madura	Bruto	3,608 <sup>B</sup>	2,374 <sup>D</sup>	84,692 <sup>B</sup>	19,080 <sup>B</sup>	12,576 <sup>A</sup>
Hex				3,728 <sup>B</sup>	1,714 <sup>D</sup>	78,752 <sup>B</sup>	19,598 <sup>B</sup>	13,044 <sup>A</sup>	1,832 <sup>C</sup>
DCM	1,766 <sup>C</sup>			1,150 <sup>D</sup>	53,802 <sup>B</sup>	10,954 <sup>B</sup>	12,932 <sup>A</sup>	0,870 <sup>C</sup>	
AcEtOH	4,122 <sup>B</sup>			2,072 <sup>D</sup>	102,716 <sup>A</sup>	22,412 <sup>B</sup>	13,582 <sup>A</sup>	2,086 <sup>C</sup>	
BuOH	3,470 <sup>B</sup>			2,078 <sup>D</sup>	78,184 <sup>B</sup>	16,628 <sup>B</sup>	14,794 <sup>A</sup>	2,130 <sup>C</sup>	
Aq	4,850 <sup>A</sup>			3,278 <sup>C</sup>	101,490 <sup>A</sup>	31,210 <sup>A</sup>	13,858 <sup>A</sup>	2,672 <sup>B</sup>	
Serrapilheira	Bruto			4,148 <sup>B</sup>	3,076 <sup>C</sup>	70,480 <sup>B</sup>	17,374 <sup>B</sup>	12,932 <sup>A</sup>	2,166 <sup>C</sup>
	Hex		3,985 <sup>B</sup>	3,286 <sup>C</sup>	83,640 <sup>B</sup>	21,656 <sup>B</sup>	14,474 <sup>A</sup>	2,440 <sup>B</sup>	
	DCM		2,486 <sup>C</sup>	1,858 <sup>D</sup>	57,842 <sup>B</sup>	13,628 <sup>B</sup>	13,068 <sup>A</sup>	1,034 <sup>C</sup>	
	AcEtOH		4,798 <sup>A</sup>	2,278 <sup>D</sup>	99,144 <sup>A</sup>	20,198 <sup>A</sup>	13,302 <sup>A</sup>	2,480 <sup>B</sup>	
	BuOH		2,586 <sup>C</sup>	2,024 <sup>D</sup>	64,470 <sup>B</sup>	15,568 <sup>B</sup>	11,218 <sup>A</sup>	1,026 <sup>C</sup>	
	Aq		4,218 <sup>B</sup>	2,824 <sup>D</sup>	89,258 <sup>A</sup>	22,184 <sup>B</sup>	12,258 <sup>A</sup>	2,306 <sup>B</sup>	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade

A massa fresca da radícula (MFR) de *C. fissilis* (Tabela 7), semelhante a sua MFPA, foi pouco afetada pelos tratamentos. A maioria dos extratos e frações só provocaram reduções na maior concentração. Entretanto, o extrato bruto de serrapilheira, promoveu a redução de MFR mesmo na menor concentração. A fração Aq folhas maduras e AcEtOH serrapilheira não influenciaram a MFR em nenhuma das concentrações.

A massa seca da parte aérea das plântulas de *C. fissilis* (Tabela 7) não diferiram do controle, sendo assim os extratos e frações não afetaram este parâmetro.

A massa seca da radícula (MSR) de *C. fissilis* (Tabela 7), foi afetada pela grande maioria dos tratamentos. As frações DCM, dos dois tipos de folhas e Hex da serrapilheira causaram a maior redução na MSR na concentração de 1,25 mg/mL. Os extratos brutos afetaram a MSR em todas as concentrações testadas. Na maior concentração testada, todas as frações apresentaram as menores médias e apenas as frações de acetato de etila, dos dois tipos foliares, Aq de folhas maduras e BuOH de serrapilheira, foram semelhantes ao controle na menor concentração testada. O tipo foliar não teve influência sobre os resultados.

### 3.4. pH e Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ )

O pH das amostras variou entre 3 a 6, sendo as amostras com concentração de 10mg/mL com pH mais ácido (Tabela 8). Para realizar o bioensaio de germinação não houve correção do pH, no entanto a possível influencia desse fator nos resultados foi investigada. O maior potencial osmótico, dos extratos e frações, encontrado foi -0,1mPa, as amostras na concentração de 10mg/mL, em geral, apresentaram os maiores valores de  $\Psi_s$  (Tabela 8).

Tabela 8 – pH e Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) dos extratos e frações de folhas maduras e serrapilheira de *Eucalyptus urograndis*, nas diferentes concentrações (mg/mL) testadas;

Folha	Extratos	pH				$\Psi_s$ (Mpa)			
		Concentração em mg/mL				Concentração em mg/mL			
		1,25	2,5	5	10	1,25	2,5	5	10
Madura	Bruto	5,05	4,06	3,55	3,29	0	0	0	-0,09
	Hex	6,52	6,03	4,31	3,34	-0,01	-0,01	-0,02	-0,07
	DCM	4,97	4,45	3,10	3,06	0	0	-0,06	-0,08
	AcEtOH	3,87	3,42	3,11	3,0	0	0	-0,06	-0,06
	BuOH	5,23	4,32	3,84	3,6	-0,03	-0,04	-0,05	-0,06
	Aq	6,18	6,14	5,69	5,2	0	0	-0,02	-0,08
Serrapilheira	Bruto	5,33	4,42	3,73	3,6	0	0	0	0
	Hex	6,42	6,35	5,01	3,35	-0,01	-0,03	-0,03	-0,09
	DCM	4,61	4,55	3,24	3,12	0	-0,01	-0,03	-0,06
	AcEtOH	3,8	3,4	3,07	3,0	0	0	-0,02	-0,05
	BuOH	5,0	4,15	3,68	3,51	0	-0,04	-0,09	-0,1
	Aq	5,95	5,25	4,7	4,43	0	-0,01	-0,06	-0,1
Controle		5,9				0			

Os testes simulando a faixa de pH que compreendia as amostras avaliadas neste estudo, demonstraram que o pH das amostras não influenciou na germinação e crescimento inicial das plântulas de alface (Tabela 9) e de cedro rosa (Tabela 10).

Tabela 9 - Germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* em função do pH.

<b>pH</b>	<b>%G</b>	<b>IVG</b>	<b>CPA</b>	<b>CR</b>	<b>MFPA</b>	<b>MFR</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>
Controle	98 <sup>A</sup>	23,17 <sup>A</sup>	0,62 <sup>A</sup>	6,38 <sup>A</sup>	4,96 <sup>A</sup>	5,29 <sup>A</sup>	0,36 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>
3,0	98 <sup>A</sup>	23,58 <sup>A</sup>	0,62 <sup>A</sup>	5,79 <sup>A</sup>	4,94 <sup>A</sup>	5,31 <sup>A</sup>	0,35 <sup>A</sup>	0,29 <sup>A</sup>
3,5	98 <sup>A</sup>	23,75 <sup>A</sup>	0,64 <sup>A</sup>	6,45 <sup>A</sup>	4,97 <sup>A</sup>	5,42 <sup>A</sup>	0,36 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>
4,0	99 <sup>A</sup>	24,38 <sup>A</sup>	0,64 <sup>A</sup>	5,84 <sup>A</sup>	4,86 <sup>A</sup>	5,25 <sup>A</sup>	0,37 <sup>A</sup>	0,27 <sup>A</sup>
4,5	100 <sup>A</sup>	24,42 <sup>A</sup>	0,6 <sup>A</sup>	5,77 <sup>A</sup>	4,91 <sup>A</sup>	5,21 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>
5,0	100 <sup>A</sup>	23,71 <sup>A</sup>	0,6 <sup>A</sup>	6,40 <sup>A</sup>	4,89 <sup>A</sup>	5,38 <sup>A</sup>	0,35 <sup>A</sup>	0,33 <sup>A</sup>
6,0	99 <sup>A</sup>	23,25 <sup>A</sup>	0,58 <sup>A</sup>	6,0 <sup>A</sup>	4,88 <sup>A</sup>	5,44 <sup>A</sup>	0,35 <sup>A</sup>	0,31 <sup>A</sup>

Média seguidas da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Germinação e crescimento inicial de *Cedrela fissilis* em função do pH.

<b>pH</b>	<b>%G</b>	<b>IVG</b>	<b>CPA</b>	<b>CR</b>	<b>MFPA</b>	<b>MFR</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>
Controle	82,5 <sup>A</sup>	1,93 <sup>A</sup>	5,99 <sup>A</sup>	3,79 <sup>A</sup>	128,12 <sup>A</sup>	36,15 <sup>A</sup>	14,56 <sup>A</sup>	3,30 <sup>A</sup>
3,0	85 <sup>A</sup>	1,91 <sup>A</sup>	5,83 <sup>A</sup>	3,76 <sup>A</sup>	15,38 <sup>A</sup>	27,59 <sup>A</sup>	13,16 <sup>A</sup>	3,21 <sup>A</sup>
3,5	81,7 <sup>A</sup>	1,96 <sup>A</sup>	5,95 <sup>A</sup>	3,81 <sup>A</sup>	116,58 <sup>A</sup>	33,16 <sup>A</sup>	14,31 <sup>A</sup>	2,98 <sup>A</sup>
4,0	84,3 <sup>A</sup>	1,87 <sup>A</sup>	6,01 <sup>A</sup>	3,87 <sup>A</sup>	121,54 <sup>A</sup>	34,03 <sup>A</sup>	14,47 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>
4,5	85 <sup>A</sup>	1,90 <sup>A</sup>	6,11 <sup>A</sup>	3,94 <sup>A</sup>	118,78 <sup>A</sup>	32,92 <sup>A</sup>	14,39 <sup>A</sup>	3,24 <sup>A</sup>
5,0	80,5 <sup>A</sup>	1,94 <sup>A</sup>	5,92 <sup>A</sup>	3,85 <sup>A</sup>	125,04 <sup>A</sup>	36,74 <sup>A</sup>	14,53 <sup>A</sup>	3,29 <sup>A</sup>
6,0	83,4 <sup>A</sup>	1,89 <sup>A</sup>	5,79 <sup>A</sup>	3,88 <sup>A</sup>	126,47 <sup>A</sup>	33,98 <sup>A</sup>	14,51 <sup>A</sup>	3,19 <sup>A</sup>

Média seguidas da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

O potencial osmótico das amostras não afetou a germinação, uma vez que sementes de alface expostas a dois  $\Psi$ s, que compreendem os valores encontrados para os extratos e frações não afetaram nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 11). As sementes de cedro rosa (Tabela 12), também não foram afetadas pelo potencial osmótico das amostras.

Tabela 11 - Germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* em função do potencial osmótico.

$\Psi_s$	%G	IVG	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Controle	82,5 <sup>A</sup>	1,93 <sup>A</sup>	5,99 <sup>A</sup>	3,79 <sup>A</sup>	128,12 <sup>A</sup>	36,15 <sup>A</sup>	14,56 <sup>A</sup>	3,30 <sup>A</sup>
- 0,05	100 <sup>A</sup>	23,33 <sup>A</sup>	0,61 <sup>A</sup>	6,13 <sup>A</sup>	4,91 <sup>A</sup>	5,23 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>	0,32 <sup>A</sup>
- 0,1	99 <sup>A</sup>	22,75 <sup>A</sup>	0,59 <sup>A</sup>	6,25 <sup>A</sup>	4,95 <sup>A</sup>	5,36 <sup>A</sup>	0,37 <sup>A</sup>	0,31 <sup>A</sup>

Média seguidas da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Scott e

Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 12 - Germinação e crescimento inicial de *Cedrela fissilis* em função do potencial osmótico.

$\Psi_s$	%G	IVG	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Controle	98 <sup>A</sup>	23,17 <sup>A</sup>	0,62 <sup>A</sup>	6,38 <sup>A</sup>	4,96 <sup>A</sup>	5,29 <sup>A</sup>	0,36 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>
- 0,05	100 <sup>A</sup>	23,33 <sup>A</sup>	0,61 <sup>A</sup>	6,13 <sup>A</sup>	4,91 <sup>A</sup>	5,23 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>	0,32 <sup>A</sup>
- 0,1	99 <sup>A</sup>	22,75 <sup>A</sup>	0,59 <sup>A</sup>	6,25 <sup>A</sup>	4,95 <sup>A</sup>	5,36 <sup>A</sup>	0,37 <sup>A</sup>	0,31 <sup>A</sup>

Média seguidas da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Scott e

Knott a 5% de probabilidade.

### 3.5. Composição fitoquímica das folhas maduras e serrapilheira de *E. urograndis*

#### Prospecção química por Cromatografia de camada delgada

Pela análise de CCD das folhas maduras e serrapilheira de *E. urograndis* (Tabela 13), pode-se observar que os grupos químicos alcaloides e naftoquinonas foram caracterizados somente nos extratos etanólicos e hexano nas folhas maduras e serrapilheiras. Os derivados de antracenos não foram detectados somente na fração butanólica das folhas maduras de eucalipto, enquanto as lignanas não foram encontradas nas folhas de serrapilheiras. Já as cumarinas não estão presentes nas frações mais polares, como o butanol e água. Os mono e sesquiterpenos mostraram bandas de identificação no extrato bruto e nas frações apolares, tais como hexano e diclorometano em ambas amostras analisadas. Triterpenos e esteróides foram identificados em todas as amostras vegetais.

Tabela 13 - Identificação dos grupos químicos no extrato bruto e suas frações de folhas maduras e de serrapilheira de *E. urograndis* pelo método de cromatografia por camada delgada.

Grupos químicos	Extrato e frações das folhas maduras						Extrato e frações das folhas de serrapilheira					
	EBE	Hex	DCM	AcEtOH	BuOH	Aq	EBE	Hex	DCM	AcEtOH	BuOH	Aq
<b>Alcaloides</b>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Derivados de antracenos</b>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cumarinas</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<b>Lignanas</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Mono e diterpenos</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<b>Naftoquinonas</b>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<b>Triterpenos e esteroides</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Flavonoides</b>												

EBE= extrato bruto etanólico, Hex = fração hexano; DCM = fração diclorometano; AcEtOH = fração acetato de etila; BuOH = fração butanólica e Aq = fração aquosa

## **Cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)**

Nas análises por CG/EM do extrato bruto etanólico e das frações mais apolares foram observadas as presenças substâncias químicas derivadas do terpeno como o monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, assim como derivados de ácidos graxos, conforme figura 4 e tabela 14. Dos monoterpenos identificados o  $\alpha$ -terpineol está presente em todas as frações analisadas e nas folhas maduras no extrato diclorometano apresenta também o endo-bornel e esse mesmo composto está ausente nos extratos etanólicos e hexânicos das folhas de serrapilheiras. O eucapitol está presente em todos os extratos de folhas da serrapilheira e ausente nos extratos apolares, enquanto o acetato de  $\alpha$ -terpineol está presente nos extratos de etanólico e hexânico as folhas de serrapilheira. O Menth-6-en-2,8-diol foi encontrado somente na fração hexânica da serrapilheira.

No extrato diclorometano os únicos sesquiterpenos identificados nas folhas de serrapilheiras foi o espatulenol e nas folhas maduras os derivados de viridiflorol. O Viridiflorol foi caracterizado nos extratos apolares das folhas maduras e serrapilheira. O cariofileno pode ser observado nos extratos brutos e hexânico de ambos os tipos de folhas coletadas. Já o calameneno, óxido de cariofileno e o cubenol foram identificados somente no extrato hexânico das folhas de serrapilheira, enquanto nas folhas maduras a flavesona, germacreno B e Cubeban-11-ol foram caracterizados. O Aromadendreno foi identificado nos extratos etanólicos e hexânico de serrapilheiras e extrato hexânico das folhas maduras. Essa mesma distribuição observa-se para o espatulenol. O sesquiterpeno álcool de coniferila está presente somente no extrato etanólico das folhas maduras. O diterpeno fitol foi identificado no extrato etanólico e em maior concentração no extrato hexânico, ambos nas folhas maduras. Por fim, o triterpeno  $\beta$ -Sitosterol foi identificado em todos os extratos derivados das folhas de serrapilheiras, porém em maior concentração no extrato hexânico das folhas maduras. Alguns picos não foram passíveis de identificação completa, porém pelo perfil de fragmentação pode-se caracterizar a presença de triterpenos com picos que estão distribuídos no cromatograma nos minutos acima de 42 minutos

Os derivados de ácidos graxos estão presentes nos extratos etanólico e hexânicos das folhas de serrapilheiras e essa mesma distribuição é vista para o tocoferol (vitamina E).

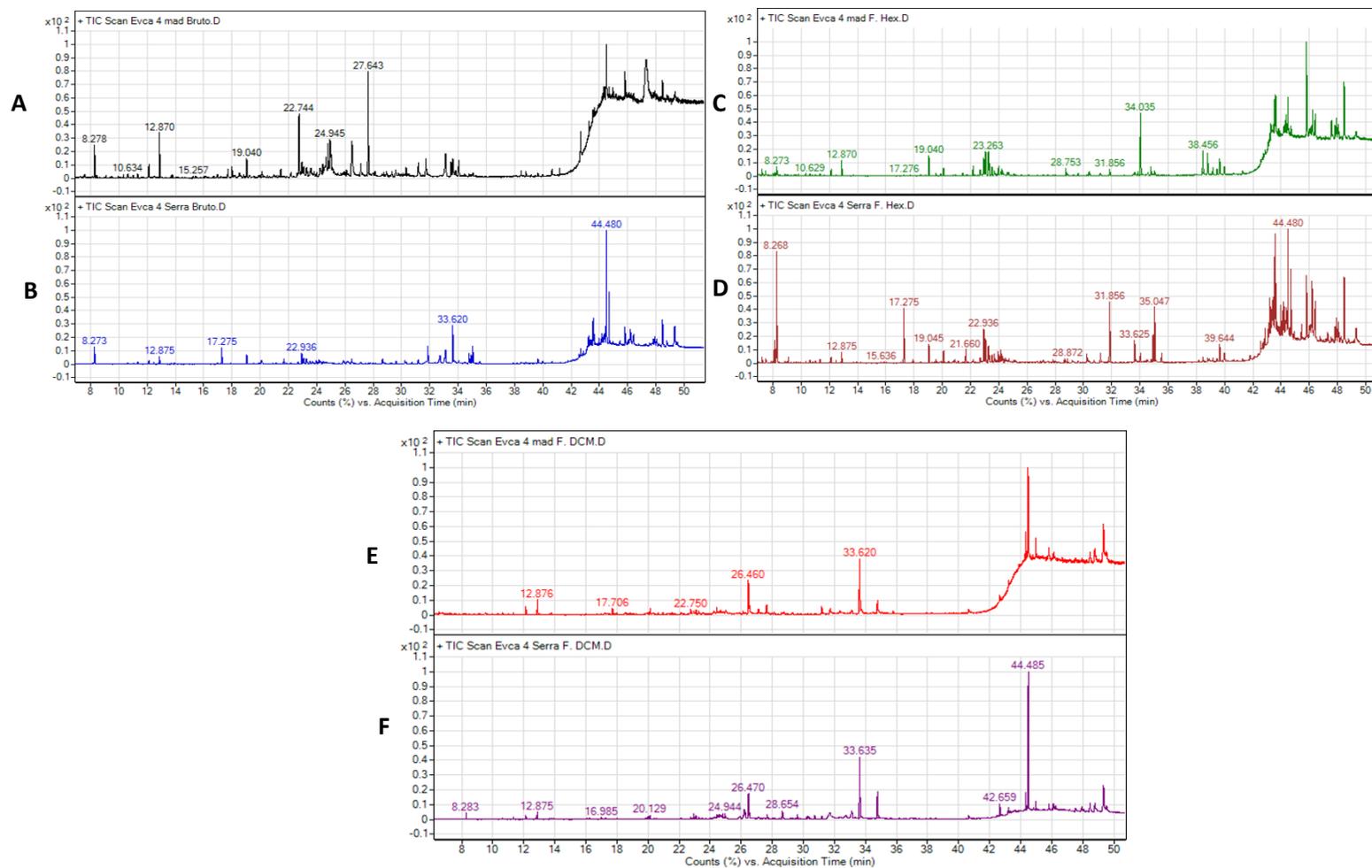


Figura 4 - Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas maduras (A) e serrapilheiras (B); extratos hexânicos das folhas maduras (C) e serrapilheiras (D); extratos diclometano das folhas maduras (E) e serrapilheiras (F)

Tabela 14 – Compostos encontrados nos extratos brutos e frações de hexano e diclorometano de folhas maduras e de serrapilheira de *Eucalyptus urograndis* por meio de Cromatografia gasosa em espectrômetro de massa (CG-EM).

RT (MIN)	Composto identificado	KI	EXTRATO ETÁNOLICO (%ÁREA) *		FRAÇÃO HEXÂNICA (%ÁREA) *		FRAÇÃO DICLOROMETANO (%ÁREA) *	
			Serrapilheira	Folhas maduras	Serrapilheira	Folhas maduras	Serrapilheira	Folhas maduras
7.474	Decane	1000				+ (0.33)		
8.107	o-Cymene	1022			+ (1.37)			
8.278	Eucalyptol	1028	+ (2.82)	+ (2.71)	+ (7,00)		+ (1.16)	
12.123	endo-Borneol	1162		+ (1.25)		+ (0.69)	+ (0.78)	+ (1.17)
12.87	$\alpha$ -Terpineol	1188	+ (1.32)	+ (4.24)	+ (0.73)	+ (1.66)	+ (1.37)	+ (2.13)
17.275	$\alpha$ -Terpinyl acetate	1349	+ (2.99)		+ (3.91)			
17.992	Menth-6-en-2,8-diol	1375		+ (1.06)				
19.04	Caryophyllene	1416	+ (1.85)	+ (1.86)	+ (1.4)	+ (2.47)		
20.103	Aromadendrene	1458	+ (1.20)		+ (1.03)	+ (0.92)		
21.66	calamenene	1521			+ (1.11)			
22.179	Flavesone	1543				+ (1.18)		
22.672	Germacrene B	1563				+ (1.01)		
22.936	Spathulenol	1578	+ (2.06)		+ (2.68)	+ (2.21)	+ (1.18)	
23.061	Caryophyllene oxide	1580			+ (2.62)			
23.087	Derivados de Viridiflorol	1581	+ (1.57)	+ (1.54)		+ (4.04)		+ (0.83)
23.263	Viridiflorol	1588			+ (1.24)	+ (2.77)		+ (0.87)
23.32	Cubeban-11-ol	1590				+ (1.39)		
24.13	Cubenol	1626			+ (0.94)			
26.522	Coniferyl alcohol	1733		+ (4.11)				
31.181	Hexadecanoic acid	1960		+ (2.17)				+ (2.12)

RT (MIN)	Composto identificado	KI	EXTRATO ETÁNOLICO (%ÁREA) *		FRAÇÃO HEXÂNICA (%ÁREA) *		FRAÇÃO DICLOROMETANO (%ÁREA) *	
			Serrapilheira	Folhas maduras	Serrapilheira	Folhas maduras	Serrapilheira	Folhas maduras
31.856	Palmitato de etila	1994	+ (3.73)		+ (4.64)			
34.035	Phytol	2112		+ (1.67)		+ (7.56)		
34.932	Linoleic acid ethyl ester	2162	+ (1.69)		+ (2.15)			
35.047	ethyl linolenate	2169	+ (3.35)		+ (4.17)			
44.677	dl- $\alpha$ -Tocopherol	3150	+ (7.24)		+ (4.22)			
45.803	$\beta$ -Sitosterol	3356	+ (3.24)		+ (5.64)	+ (10.05)	+ (1.28)	

\*indica a % da área de cada composto encontrado no cromatograma do CG/EM

## 4. DISCUSSÃO

Os resultados observados por meio do bioensaio de germinação com *L. sativa* e *C. fissilis* indicam que o híbrido *E. urograndis* apresenta fitotoxicidade sobre outras plantas, sendo seu efeito proporcional a concentração. O extrato bruto das folhas maduras e da ser-pilheira afetaram negativamente *Lactuca sativa* e *Cedrela fissilis*. Porém, a fração diclorometano causou maior inibição de germinação e crescimento inicial, sendo identificada como a fração com maior atividade alelopática negativa.

Resultados semelhantes foram observados para extratos aquosos de folhas do híbrido, em diferentes espécies cultivadas, como *Pennisetum glaucum*, conhecida como milho (SOUSA et al., 2018) e sobre as forrageiras, braquiária (*Urochloa decumbens*) e capim colômbio (*Panicum maximum*) (CARVALHO et al., 2015). Segundo Espinosa-García et al. (2008), o solo de plantação contém aleloquímicos liberados pelo híbrido que inibem a germinação e crescimento de espécies cultivadas (feijão, milho, pepino e melão), corroborando que *E. urograndis* apresenta atividade alelopática.

A relação entre efeito e concentração vem sendo observada em vários estudos. Yamagushi e colaboradores (2011), estudando o extrato aquoso de folhas de *E. globulus*, observaram a diminuição da germinação de 9 espécies cultiváveis, em que maiores efeitos inibitórios foram observados nas maiores concentrações testadas (70, 90 e 100%). A mesma correlação entre efeito e concentração também foi observada por Morsi e Abdelmigid (2016), estudando *E. globulus* e por Yang et al (2016), utilizando *E. urophylla* como planta doadora de aleloquímicos.

Para espécies nativas, sobretudo brasileiras, há poucos estudos. Carneiro et al. (2010), investigou a atividade alelopática de extrato aquosos de folhas senescentes de *E. camaldulensis*, *E. grandis* e *E. urophylla* S.T.Blake em alface, sorgo e *Anadenanthera peregrina* (angico) e *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril), espécies nativas utilizadas em reflorestamento, e verificaram que os extratos inibiam a germinação de alface, mas não afetaram a germinação de angico e tamboril, diferente dos resultados obtidos para o cedro rosa-rosa no presente estudo, que foi afetado pelos extratos de *E. urograndis*. Isso evidencia que espécies nativas podem responder de maneira diferente aos compostos presentes nas folhas de eucalipto.

O cedro rosa apresenta potencial para utilização de sua madeira para fins comerciais e pode ser indicado para compor sistemas agroflorestais. Suas mudas podem ser plantadas

com diversos cultivos para a alimentação e gramíneas, para pastagem. Nesses sistemas, o plantio de outras espécies florestais de crescimento rápido e podem proporcionar o sombreamento do cedro rosa acelerando, assim, seu crescimento. *E. urograndis* é uma espécie florestal de crescimento rápido, também em sistemas agroflorestais, e poderia, em teoria, ser consorciado com o cedro rosa (MELOTTO et al., 2019).

Estudos anteriores (SOUZA et al., 2007; ALENCAR et al., 2011) indicam que espécies de eucalipto podem desempenhar a função de pioneira, propiciando sombreamento para as espécies nativas. No entanto, o presente trabalho não corrobora com estes resultados, uma vez que o cedro rosa-rosa foi bastante afetado pelos compostos presentes nas folhas de *E. urograndis*. Sendo assim, sua utilização não pode ser propagada como regra geral, mesmo que algumas espécies de *Eucalyptus* tenha exercido o papel de facilitadoras com êxito, já que estudos também demonstram a baixa diversidade e regeneração lenta em locais com *E. citriodora* (EVARISTO et al., 2016), *Eucalyptus* spp. (NERI et al., 2005) sendo esses efeitos associados a alelopatia.

Os maiores efeitos negativos foram observados para as frações DCM, de baixa polaridade e, portanto, pouco solúveis em água. Baseados em diversos estudos com extratos aquosos esperava-se que as frações polares fossem as mais ativas, visto que os extratos aquosos geralmente são ricos em compostos fenólicos e estes por sua vez têm a sua atividade fitotóxica conhecida e bastante citada (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; CHON; NELSON, 2010). Inclusive a atividade alelopática de extratos aquosos de folhas do híbrido já foi demonstrado em gramíneas (SOUSA et al., 2018; CARVALHO et al., 2015). No entanto, para as espécies do gênero *Eucalyptus* os óleos essenciais (OE) também demonstraram potencial alelopático (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; KAUR et al., 2011; TOMAZ et al., 2014). Os OE são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos (BARBOSA et al., 2016) e isso reforça a importância dos óleos essenciais para a atividade alelopática das espécies de eucalipto.

As análises químicas por CG-EM, nos extratos brutos e frações Hex e DCM detectaram a presença de vários derivados de terpenos, principalmente na fração Hex, dos quais muitos já foram identificados nos óleos essenciais (OE) extraídos de espécies de eucalipto (BARBOSA et al., 2016). A atividade alelopática de terpenóides, já foi demonstrada em vários estudos.

O eucaliptol é o principal composto da fração Hex serrapilheira de *E. urograndis*, também encontrado nos extratos brutos, na fração Hex de folhas maduras e DCM da

serrapilheira, já teve seu efeito alelopático demonstrado, no qual este composto, isolado do OE de *Artemisia vulgaris*, provocou a redução do comprimento da parte aérea e raiz de *Lepidium sativum* (BARNEY; HAY; WESTON, 2005). Segundo Cheng e Cheng (2015), o eucaliptol pode causar anormalidade no DNA, aumento de vacúolos e encurtamento das raízes.

O monoterpeno  $\alpha$ -terpineol, encontrado nos extratos brutos e frações Hex e DCM, também presente no OE de *E. saligna*, *E. cinérea*, entre outras espécies (BARBOSA et al., 2016). Este monoterpeno também é encontrado em OE de *E. globulus* do qual já demonstrou sua atividade alelopática (GOLDBECK et al., 2014).

Os terpenos viridiflorol, cariofileno, espatulenol, borneol, aromadendreno entre outros, encontrados nos extratos brutos e nas frações Hex e DCM, também podem ser encontrados em OE, inclusive em outras espécies de plantas com atividade alelopática e/ou citotóxica (LÓPEZ; BONZANI; ZYGADLO, 2009; SOUZA-FILHO, et al., 2009; BOUAJAJ et al., 2013; ARANITI; ZUMBO; ABENAVOLI, 2018).

A intensidade do efeito inibitório causado pelos terpenóides depende de sua concentração testada, no entanto os estudos com óleos essenciais já mostraram que são necessárias pequenas concentrações (0,00625 a 2,5  $\mu\text{L/mL}$ , em geral) para que seja observada a atividade alelopática (KAUR et al., 2011; JAIME; FERRER, 2018). Sendo assim, é possível supor, que a atividade fitotóxica observada testando os extratos brutos e frações Hex e DCM possa ser causada, em parte, por esses compostos que são liberados naturalmente por volatilização (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; SANGEETHA; BASKAR, 2015). A presença destes nas folhas de *E. urograndis* elucidada uma das possíveis causas para a baixa diversidade, tanto de plantas como de animais, no sub-bosques das plantações do híbrido, uma vez que estes compostos quando volatilizados das partes da planta são difundidos para o meio e vão para o solo, por serem mais pesados que o ar e lá podem agir sobre outras espécies (RIZVI et al., 1999).

No entanto a presença de mono e sesquiterpenos nas frações DCM não é suficiente para afirmar que os resultados observados são causados por estes compostos, uma vez que não representam a maioria dos metabolitos encontrados nas supracitadas frações, além de não haver registros de trabalhos que demonstrem a atividades desses compostos isoladamente.

Além disso, quando presentes em extratos (que são misturas complexas), os compostos podem apresentar sinergismo ou antagonismo com outros componentes, portanto, não é

possível, sem o teste de maneira isolada, afirmar que os resultados observados sejam causados por um ou outro composto em particular (KAUR et al., 2011; REIGOSA et al., 2013; GRISI et al., 2015; PEREIRA et al., 2018). Poucos trabalhos fazem esse tipo de investigação.

Entretanto, a marcante atividade alelopática da fração DCM pode fornecer subsídios para a produção de bioherbicidas a partir de folhas de *E. urograndis*. Como o eucalipto produz uma grande quantidade de folhas, que com sua decomposição lenta, liberam aleloquímicos de forma contínua para o ambiente (ESPINOSA-GRACIA et al., 2008), essa seria uma forma de reduzir os impactos causados pelas plantações.

Outros metabólitos com atividade fitotóxica também foram identificados, como flavonoides, fenóis, hidroquinonas e antracenos. Os triterpenos e esteroides também foram identificados nas frações polares e não polares e no extrato bruto.

Segundo Santos et al. (2011), a maioria dos metabólitos secundários com alelopatia conhecida são os terpenos e compostos fenólicos. Muitos compostos fenólicos solúveis podem ser encontrados em folhas de *E. urograndis*, como os ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, cafeico, cumárico e ferrúlico, p-Hidroxibenzaldeído, narigenina e isoquercitina (CHAPUIS-LARDY et al., 2002; SANTOS et al., 2012). Vários desses compostos tiveram sua atividade demonstrada.

Em trabalho com *Calopogonium mucunoides*, investigando o potencial alelopático de extratos brutos, de hexano, DCM, acetato de etila e metanol nas ervas daninhas *Cassia tora*, *Mimosa pudica* e *Cassia occidentalis*. foram identificados nos extratos os ácidos fenólicos ferúlico, cafeico, p anísico e clorogênico e os flavonóides quercetina, rutina, genisteína, kaempferol e naringenina e uma bioensaio com as mesmas ervas daninhas comprovou a atividade alelopática desses compostos de forma isolada (SANTOS et al., 2011).

Essas observações, somadas aos resultados obtidos neste estudo, em que ambos extratos etanólicos (brutos) e frações apresentaram atividade alelopática, principalmente DCM, sugerem que a atividade alelopática do híbrido em questão possa ser causado tanto por terpenos (pouco solúveis em água), quanto pelos compostos fenólicos (solúveis em água). Reforçando mais uma vez a potencialidade de causar efeitos negativos nas outras plantas.

A porcentagem de germinação, o IVG e o crescimento inicial de ambas as espécies receptoras foram afetados negativamente pelos compostos presentes nos extratos e frações do híbrido. Os aleloquímicos interferem a nível celular e molecular, essas alterações são refletidas nas partes que compõe as plantas (BLANCO, 2007). Podem ocorrer alterações na permeabilidade da membrana celular, na divisão e alongamento das células, na atividade de

enzimas antioxidantes, aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO's), alteração em outras enzimas, que inclusive participam da germinação de sementes, impactos na eficiência da fotossíntese, provocando alteração na atividade dos cloroplastos e nas concentrações de clorofilas, e também na respiração celular, entre outros efeitos negativos. Também são relatadas alterações nas raízes e radículas, com modificações na morfologia e função (BLANCO, 2007; CHENG; CHENG, 2015).

O crescimento da radícula foi afetado pelos extratos etanólicos e suas frações apresentando menor crescimento em relação ao controle. Além de apresentar escurecimento do ápice radicular nas maiores concentrações. Os aleloquímicos podem atuar na inibição do alongamento e na divisão celular (CHENG; CHENG, 2015). A redução no comprimento da radícula de plântulas de alface pode ser devido a inibição do alongamento celular, uma vez que a massa seca das radículas não apresentaram grandes diferenças. Porém para o cedro rosa houve redução tanto no comprimento quanto na massa seca da radícula, indicando para essa espécie uma possível interferência na divisão celular. Para confirmar tal suposição, seria necessária a análise do índice mitótico radicular das plantas receptoras.

Outros estudos com espécies de eucalipto também relataram o maior efeito tóxico de extratos vegetais e OE's no sistema radicular das plantas receptoras (YAMAGUSHI et al., 2011; ZHANG et al., 2012 ARAGÃO et al. 2015; JAIME; FERRER, 2018).

Em geral as radículas são mais afetadas do que a parte aérea das plântulas (CHON; NELSON, 2010). De acordo com Tanveer et al. (2012), isso se deve ao fato de as radículas serem expostas a maiores concentrações dos aleloquímicos do meio, por surgirem antes da parte aérea.

Apesar da sua variação na composição química, o tipo foliar (maduras ou serrapilheira) exerceu pouca influência sobre os parâmetros analisados, apenas no IVG a serrapilheira causou um maior atraso na germinação, o que resultou em valores menores de IVG em comparação com as folhas maduras. Estes resultados evidenciam que mesmo após a retirada da plantação, os restos culturais continuam sendo fonte de aleloquímicos e permanecem no ambiente afetando outras espécies. No entanto, estudos apontam que a idade da plantação pode ter mais influência na capacidade do eucalipto de suprimir o desenvolvimento de outras plantas do que o tipo foliar. Zhang et al. (2010) verificaram que a idade da plantação de *E. grandis* influencia de maneira diferente as plantas alvo, sendo os maiores efeitos inibitórios observados para a plantação mais jovem (2 anos), além disso a quantificação dos compostos também exibiu resultado semelhante.

O potencial osmótico e pH das amostras testadas em estudos dessa natureza devem ser considerados, uma vez que podem influenciar nos resultados (FERREIRA; AQUILA, 2000; DIAS; PEREIRA; DIAS, 2016). O potencial osmótico dos extratos e frações medidos não afetou a germinação nem o crescimento inicial das plântulas de alface e cedro rosa, uma vez que os valores encontrados são menores que o valor considerado crítico (-0,2 Mpa) (REIGOSA et al., 2013).

A presença de ácidos orgânicos poderia explicar o caráter mais ácido de algumas frações. Os testes simulando os mesmos valores de pH encontrados nas amostras testadas revelaram que este parâmetro não exerceu influência sobre os resultados observados para os extratos e frações testadas. Segundo Eberlein (1987), os valores de pH ideais para que haja a germinação sem nenhum prejuízo para a plântula encontra-se na faixa de pH 4,0 a 10,0. No entanto, os resultados obtidos revelaram que em pH 3,0 também ocorre germinação sem efeitos negativos para as espécies selecionadas como receptoras. De forma semelhante, Dornelas et al. (2008), avaliando a germinação de alface em diferentes pH's, concluíram que pH entre 3,0 e 9,0, não influenciava de forma significativa a %G, IVG, comprimento de raiz e massa seca. Para o cedro rosa, os resultados nos testes com diferentes pH's também revelaram que tal parâmetro não influenciou nos resultados obtidos no bioensaio de germinação.

Os resultados indicam que os aleloquímicos presentes nos extratos etanólicos de folhas maduras e da serrapilheira de *E. urograndis* (doadora) podem produzir efeito alelopático sobre as espécies vizinhas (receptoras), porém seu comportamento em campo deve ser estudado afim de compreender como os fatores bióticos possa influenciar na ação de tais aleloquímicos. De acordo com Reigosa et al. (2013), fatores como água, luz e temperatura, podem interferir na estrutura química e atividade dos aleloquímicos no solo, quando somados a ação da biota presente e a estrutura desse solo.

Em campo, os resultados podem diferir dos ensaios in vitro e podem ter interferência de outros fatores ligados as plantações de eucalipto. Yang et al. (2017) no entanto, sugerem em seu estudo que a baixa diversidade de espécies nos sub-bosques de plantações de eucalipto se deve a compactação do solo e a deficiência na quantidade de água no interior de plantações e isso influencia negativamente a germinação de outras espécies, sendo esse um fator a ser considerado.

Além disso, o comportamento do composto no solo é complexo, e pode sofrer influência de diferentes fatores, como a condição do solo, das plantas envolvidas e fatores climáticos. Quando presente no solo, o aleloquímico pode ser adsorvido nas partículas do

solo e ser metabolizado por microrganismo presentes no solo. Além disso, os aleloquímicos podem estar dissolvidos na solução do solo e sendo assim sua atividade será diretamente relacionada com a sua concentração (KOBAYASHI, 2004).

Por tanto, são necessários estudos complementares para a compreensão da atividade fitotóxica do híbrido em campo e suas possíveis aplicações na composição de sistemas agroflorestais e implicações do uso.

## 5. CONCLUSÃO

Nos extratos e frações foram detectadas a presença de alcaloides, lignanas, cumarinas, triterpenos e esteroides, mono e diterpenos, derivados de antracenos e naftoquinonas. Os principais compostos encontrados no extrato bruto e frações hexano e diclorometano, segundo a CG-EM foram eucaliptol,  $\alpha$ -terpineol (encontrado em todas as amostras), cariofileno, espatulenol e sistosterol.

Extratos foliares de *E. urograndis* apresentam potencial alelopático, no entanto a intensidade dos efeitos negativos causados depende da espécie alvo e da concentração ao qual estão expostas.

A fração DCM de folhas de *E. urograndis* demonstra ação alelopática, causando inibição de germinação e crescimento inicial. Sendo assim, apresenta potencial para utilização como bioerbicida, entretanto estudos direcionados a essa finalidade se fazem necessários.

A utilização do híbrido na composição de sistemas agroflorestais pode ser indicada, com ressalvas, dado o efeito negativo causado pelos extratos e frações de suas folhas na germinação e crescimento inicial de *L. sativa*. São necessários estudos com outras espécies tanto nativas quanto cultivadas para que sejam selecionadas as espécies que melhor se adequem.

*Cedrela fissilis* apresentou grande sensibilidade aos aleloquímicos presentes nas folhas de *E. urograndis*, e por tanto a espécie possivelmente seria afetada se cultivada em local com o híbrido e seus resíduos, não sendo assim recomendada a adoção de *E. urograndis* em restaurações vegetacionais com cedro rosa e nem em plantios mistos para fins comerciais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A.L. Regeneração natural avançada de espécies arbóreas nativas no sub-bosque de povoamentos de *Eucalyptus saligna* Smith., na Zona da Mata Sul de Pernambuco. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 183-192, 2011.

ARAGÃO, F.B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v.35, n. 1, p. 259-272, 2015.

ARANITI, F.; ZUMBO, A.; ABENAVOLI, M.R. Phytotoxic activity and GC-MS chemical characterization of apple mint foliar volatiles and essential oils. **Journal of Allelochemical Interactions**, v. 4, n. 1, p. 23-31, 2018.

BARBOSA, L.C.A.; FILOMENO, C.A.; TEIXEIRA, R.R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. **Molecules**, n. 21, 2016.

BARNEY, J. N.; HAY, A. G.; WESTON, L. A. Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*), **J. Chem. Ecol.**, v. 31, n. 2, p. 247-265, 2005.

BENCHAA, S.; HAZZIT, M.; ABDELKRIM, H. Allelopathic Effect of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil and Its Potential Use as Bioherbicide. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 8, 2018.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed: Physiology of Development and Germination**. Plenum Press, New York, 1994.

BLANCO, J.A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling**, v. 209, p. 65–77, 2007.

BROOKER, I. Botany of the eucalypts. In: Coppen, J.J.W. **Eucalyptus: The genus Eucalyptus**. Taylor and Francis, London, p. 3-35, 2002.

BOUAJAJ, S. et al. Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 27, n. 18, p. 1673-1676, 2013.

CARNEIRO, I. L. R.; GARCIA, Q. S.; KARAM, D. Avaliação do potencial alelopático de três espécies de *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *grandis* e *urophylla*) na germinação de

espécies cultivadas e nativas do cerrado. In: **XXVI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, Ouro Preto, MG, 2008.

CARVALHO, F.P. et al. The allelopathic effect of *Eucalyptus* leaf extract on grass forage seed. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 33, n. 2, p. 193-201, 2015.

CECCON, E. Production of bioenergy on small farms: a two-year agroforestry experiment using *Eucalyptus urophylla* intercropped with rice and beans in Minas Gerais, Brazil. **New Forests**, v. 35, p. 285–298, 2008.

CHAPUIS-LARDY, L.; CONTOUR-ANSEL, D.; BERNHARD-REVERSAT, F. High-performance liquid chromatography of water-soluble phenolics in leaf litter of three *Eucalyptus* hybrids (Congo). **Plant Science**, v. 163, p. 217-222, 2002.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, art. 1020, p. 1-16, 2015.

CHON, S.U.; NELSON, C.J. Allelopathy in Compositae plants. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 349–358, 2010.

COOK, R.L.; BINKLEY, D.; STAPE, J.L. *Eucalyptus* plantation effects on soil carbon after 20 years and three rotations in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.359, p. 92–98, 2016.

DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Water Potential and Viability of Seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a Tropical Tree Species, Based upon Different Levels of Drying. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.55, n.4, p. 583-590, 2012.

DIAS, A. S.; PEREIRA, I. P.; DIAS, L. S. Investigating and modeling the combined effects of pH and osmotic pressure on seed germination for use in phytoactivity and allelopathic research. **Plant Biosystems**, 2016.

EBERLEIN, C. V. Germination of *Sorghum alnum* seeds and longevity in soil. **Weed Science**, v. 35, n. 6, p. 796-801, 1987.

ESPINOSA-GARCÍA, F.J.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E.; QUIROZ-FLORES, A. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp plantations on germination and early growth of annual crops. **Allelopathy Journal**, v. 21, n. 1, pg. 25-37, 2008

EVARISTO, V.T.; BRAGA, J.M.A.; NASCIMENTO, M.T. Atlantic Forest regeneration in abandoned plantations of eucalypt (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill and L.A.S.Johnson) in Rio de Janeiro, Brazil, **Interciencia**, v. 36, n. 6, pg. 431-436, Caracas, Venezuela, 2016.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 (edição especial), pg.175-204, 2000.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciênc. agrotec.**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

**FLORA DO BRASIL 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >.

GOLDBECK, J.C. et al. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 304–309, 2014.

GRISI, P.U. et al. Phytotoxicity and identification of secondary metabolites of *Sapindus saponaria* L. leaf extract. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 339–349, 2015.

HE, S.L.; WANG, S.Q.; WANG, Q.Y.; ZHANG, C. Y.; ZHANG, Y.M.; LIU, T.Y.; YANG, S.X.; KUANG, Y.; ZHANG, Y.X.; HAN, J.Y.; QIN, J.C. Allelochemicals as growth regulators: A review. **Allelopathy Journal**, n. 48, v. 1, p. 15-26, 2019.

IGBE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura.** Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-8, 2018.

JAIME, M.D.I.; FERRER, M.A.B. Post-emergent herbicidal activity of *Eucalyptus globulus* Labill. essential oil. **NEREIS**, v. 10, p. 25-36, 2018.

KAUR, S.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 4, p. 297-302, 2011.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1–7, 2004.

KRZYZANOWSKI FC; VIEIRA RD e FRANÇA NETO JB. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: ABRATES. 218p., 1999.

LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. An. **Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro. v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LÓPEZ, M.L., BONZANI, N.E., ZYGADLO, J.A. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 882-890, 2009.

MAGUIRE JD. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MARTELLO, F.; BELLO, F.; MORINI, M.S.C.; SILVA, R.R.; SOUZA-CAMPANA, D.R.; RIBEIRO, M.C.; CARMONA, C.P. Homogenization and impoverishment of taxonomic and functional diversity of ants in *Eucalyptus* plantations. **Scientific Reports**, n. 8, p. 3266, 2018.

MELOTTO, A.M; LAURA, V.A.; BUNGENSTAB, D.J.; FERREIRA, A.D. Espécies florestais em sistemas de produção em integração. In: BUNGENSTAB, D. J.; ALMEIDA, R. G.; LAURA, V. A.; BALBINO, L. C.; FERREIRA, A. D. **ILPF: inovação com integração de lavoura, pecuária e floresta**. Embrapa Cerrados, 2019.

MORSI, M.M.; ABDELMIGID, H.M. Allelopathic activity of *Eucalyptus globulus* leaf aqueous extract on *Hordeum vulgare* growth and cytogenetic behavior. **Australian Journal Crop Science**, v. 10, n. 11, p. 1551-1556, 2016.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2.24.

NASCIMENTO, W.M.; CRODA, M.D.; LOPES, A.C.A. Produção de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alfaca termotolerantes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.3, p.510-517, 2012.

NERI, A.V.; CAMPOS, E.P.; DUARTE, T.G.; NETO, J.A.A.M.; SILVA, A.F.; VALENTE, G.E. Regeneração de espécies nativas lenhosas sob plantio de *Eucalyptus* em área de Cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 19, n. 2, p. 369-376, 2005.

PEREIRA, M.O. et al. Qualidade de sementes e mudas de *Cedrela fissilis* Vell. em função da biometria de frutos e sementes em diferentes procedências. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.4, p.376-385, 2017.

PEREIRA, J.C. et al. Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L.. **Rev. Ceres.**, v. 65, n.3, p. 243-252, 2018.

PINTO JUNIOR, J.E.; SANTAROSA, E.; GOULART, I.C.G.R. Histórico do cultivo de eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. **Transferência de tecnologia florestal**. Embrapa, Brasília - DF, p.11-12, 2014.

PUIG, C.G.; REIGOSA, M.J.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; PEDROL, N. Unraveling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.

REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.

RIZVI, S. J. H., TAHIR, M.; RIZVI, V.; KOHLI, R.V.; ANSARI, A. Allelopathic Interactions in Agroforestry Systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n.6, p. 773-796, 1999.

SANGEETHA, C.; BASKAR, P. Allelopathy in weed management: A critical review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 9, p. 1004-1015, 2015.

SANTAROSA, E.; PINTO JUNIOR, J.E.; GOULART, I.C.G.R.; PENTEADO JÚNIOR, J.F. Importância socioeconômica e principais uso do eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. **Transferência de tecnologia florestal**. Embrapa, Brasília - DF, p.13-22, 2014.

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

SANTOS, S.A.O. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* × *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 120– 127, 2012.

SANTOS, S.R.G. et al. Avaliação de substratos e temperaturas para sementes de espécies florestais. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 66-76, 2015.

SILVÉRIO, F.O. et al. Effect of storage time on the composition and content of wood extractives in eucalyptus cultivated in Brazil. **Bioresource Technology**, Barking, v.99, n.11, p.4878-4886, 2008.

SOUZA, P.B. et al. Florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea do sub-bosque de um povoamento de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em VIÇOSA, MG, BRASIL. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.3, p.533-543, 2007.

SOUZA, A. F.; RAMOS, N. P.; PIZO, M. A.; HÜBEL, I.; CROSSETTI, L. O. Afforestation effects on vegetation structure and diversity of grasslands in southern Brazil: The first years. **Journal for Nature Conservation**, n. 21, p. 56– 62, 2013.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; VASCONCELOS, M.A.M.; ZOGHBI, M.G.B.; CUNHA, R.L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.

SOUZA, M.V. et al. Allelopathy of the leaf extract of *Eucalyptus* genetic material on the physiological performance of millet seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 34-45, 2018.

TANVEER, A. et al. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* LAM. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n.4, 2012.

TOMAZ, M.A.; COSTA, A.V.; RODRIGUES, W.N.; PINHEIRO, P.F.; PARREIRA, L.A.; RINALDO, D.; QUEIROZ, V.T. Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Biosci. J.**, v. 30, supplement 2, p. 475-483, 2014.

VILLELA, F. A.; FILHO, L.D.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de Polietileno Glicol 6000 e da temperatura. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

YAKUBU, I.; AMINU, S.A.; ABDLLAHI, M. Influence of Allelochemicals Substances in *Eucalyptus* Species on Agricultural Crops: A Review. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v.5, n.5, p. 25-32, 2018.

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

YANG, L. et al. Mixed allelopathic effect of *Eucalyptus* leaf litter and understory fern in South China. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 28, n. 4, p. 436–445, 2016.

YANG, X.; LI, D.; MCGROUTHER, K.; LONG, W.; LI, Y.; CHEN, Y.; LV, X.; NIAZI, N.K.; SONG, Z.; WANG, H. Effect of Eucalyptus forests on understory vegetation and soil quality. **J Soils Sediments**, n. 17, p. 2383–2389, 2017.

ZENG, R.S.; MALLIK, A.U.; LUO, S. **Allelopathy in sustainable agriculture and forestry**. New York: Springer Verlag, 426p. 2010.

ZHANG, D. et al. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. **Ecological Research**, v. 25, p. 13–23, 2010.

ZHANG, J.; AN, M.; WU, H.; LIU, D.L.; STANTON, R. Chemical composition of essential oils of four *Eucalyptus* species and their phytotoxicity on silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.). **Plant Growth Regul**, v. 68, p. 231–237, 2012.