

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

RAFAEL SHINJI AKIYAMA KITAMURA

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.  
SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing

DISSERTAÇÃO

CURITIBA  
2018

**RAFAEL SHINJI AKIYAMA KITAMURA**

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.  
SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia Regina Rocha Martins

Coorientador: Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro

**CURITIBA  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

K62a Kitamura, Rafael Shinji Akiyama  
2018 Atividade inibitória de *Myriophyllum aquaticum* (vell.)  
Verdc. sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa*  
Kützing / Rafael Shinji Akiyama Kitamura.-- 2018.  
118 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.  
Texto em português, com resumo em inglês.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
Ambiental, Curitiba, 2018.  
Bibliografia: p. 106-118.

1. Alelopatia. 2. Macrófitas aquáticas. 3. Cianobactéria.  
4. Microcistinas. 5. Tecnologia ambiental - Dissertações.  
I. Martins, Lúcia Regina Rocha, orient. II. Pagioro, Thomaz  
Aurélio, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia  
Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

---

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba  
Bibliotecária Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 098

A Dissertação de Mestrado intitulada ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Rafael Shinji Akiyama Kitamura**, no dia 28 de março de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Lucia Regina Rocha Martins - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Leila Teresinha Maranhão – UP

Prof(a). Dr(a). Adriane Martins de Freitas – UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 28 de março de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre mostrar que nunca estamos sozinhos e por me dar forças até mesmo, quando desistir de tudo parecia ser o mais fácil. Por sempre me guiar e mostrar os melhores caminhos e escolhas. E, principalmente, por ter aberto as portas da vida para que eu pudesse entrar no mestrado e vivenciar tantas coisas que me fizeram crescer pessoalmente, profissionalmente e academicamente.

Agradeço à minha mãe e irmã por sempre acreditarem em meus esforços e em minha competência para com as coisas e, principalmente, por compreenderem meus momentos de ausência e estresse durante todo o período de mestrado.

Agradeço ao meu falecido pai. Graças a você eu pude me tornar um homem digno. Mesmo após sua partida, sempre sinto que você está comigo e me auxiliando em todos os momentos, até mesmo, quando tudo parecia/parece perdido.

Agradeço aos meus amigos da vida/graduação que me deram tanta força, acreditaram em todos os meus esforços e compreenderam meus períodos de ausência. Em especial agradeço à Walquíria Biscaia de Andrade, Vanessa Leitner, Bruno Gabriel, William Benetti, Jordano Oliveira, Rhoger Sato e toda a família Silveira.

Agradeço ao Cleverson Lopes, por todas as ajudas, apoio, consolo, distrações e, principalmente por me fazer sentir seguro com as coisas.

Agradeço aos meus amigos do mestrado. Talvez essa tenha sido uma turma muito especial, pois todos nós tivemos um pensamento de ajuda e cooperação, desde o começo com o próximo. Mas, em especial, agradeço à Olga Gauza, Jéssica Matei, Bárbara Chalcoski, Renata Gabardo e todos do laboratório de Ecotoxicologia, pelas conversas, apoio e por me acalmarem quando eu precisava.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório. Com todos eu pude aprender, crescer e me divertir muito. Mas, em especial, preciso agradecer a algumas pessoas. Nataly e Matheus, obrigado por serem as duas iniciações científicas que me ajudaram em tantos momentos do meu projeto, seja em campo, quanto em laboratório. Joicy Micheletto, obrigado por me ensinar tudo o que eu pudesse aprender, principalmente no meu começo de mestrado, pois graças aos seus ensinamentos, eu obtive competência para seguir com as coisas do laboratório.

Agradeço em especial, à Ana Roberta Soares da Silva. Graças a você, eu pude aprender mais sobre a química, rir, ter um mestrado “mais leve” e conhecer e desenvolver uma amizade tão linda como a que criamos. Obrigado por me auxiliar em tantos momentos de análises, principalmente com as toxinas.

Agradeço ao Augusto Silveira por me auxiliar tanto com sua dissertação, mas principalmente pelos laços de amizade que pudemos criar durante o meu mestrado. Obrigado por todos os conselhos, conversas, apoios e pelas ajudas.

Agradeço à banca de qualificação, professora Giselle Maria Maciel e professor Rodrigo Silva pelas contribuições e sugestões de melhoria.

Agradeço à banca avaliadora pelas contribuições e por dispor um tempo para avaliar a presente pesquisa.

Agradeço à prof<sup>a</sup> Giselle ainda, principalmente pelos aprendizados e, mesmo que breve, propiciar momentos de orientação referentes à área da microbiologia e, até mesmo, com relação à carreira. Seus ensinamentos durante o mestrado foram essenciais para mim!

Agradeço à prof<sup>a</sup> Leila Maranhão por sempre acreditar em mim e, por proporcionar que eu cresça cada vez mais como um pesquisador, desde a época da graduação, até os dias atuais!

Mas, em especial, agradeço aos meus grandes orientadores de mestrado. Faltam-me palavras para agradecer a todos os ensinamentos que vocês me propiciaram e por todas as vezes que vocês acreditaram em mim. Graças ao grande lado humano de vocês eu pude aprender e crescer muito durante todo esse período de mestrado! Prof. Thomaz, muito obrigado por todas as conversas, por ter me aceitado inicialmente como seu orientado, por todas as idas em coletas e, principalmente por sempre me motivar. Prof<sup>a</sup> Lúcia, a você agradeço imensamente por acreditar e confiar em mim, como seu orientado. Seus conselhos, ajudas e trocas de conhecimento me fizeram crescer muito profissionalmente e academicamente. Admiro-te pela profissional que você é e, principalmente pelo seu lado humano/mãe de ser! Muito obrigado!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Agradeço ao PPGCTA e a UTFPR pela disponibilidade e infraestrutura.

Por fim, agradeço a todos que de certa forma contribuíram durante todo esse período de mestrado! Muito obrigado!

*“Faça com as próprias mãos!*

*As barreiras, você destrói com determinação*

*Lute, nunca abandone seu coração*

*Pare de se limitar!*

*Por conta própria você está*

*Mostre a que veio, não há nada a temer!*

*Esperar cair do céu não é a solução*

*(...)*

*Acredite em si mesmo, transformando  
fracasso em motivação*

*Enfrente os seus medos, buscando a própria  
revolução”*

(Sinera)

## RESUMO

KITAMURA, Rafael Shinji Akiyama. **Atividade inibitória de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kutzing.** 118f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

*Microcystis aeruginosa* é uma espécie de cianobactéria que frequentemente participa da degradação de corpos hídricos em episódios de florações. Espécies de macrófitas aquáticas submersas podem apresentar estratégias alelopáticas para controle do fitoplâncton e, neste contexto, o gênero *Myriophyllum* tem demonstrado potencial de inibição de cianobactérias. Este estudo buscou avaliar a atividade alelopática de *Myriophyllum aquaticum* sobre o crescimento e aspectos fisiológicos de *M. aeruginosa*. O material vegetal foi coletado no reservatório do rio Verde (Araucária-PR) e utilizado para o preparo de extratos, empregando solução hidroetanólica 80% (v/v) e água como líquidos extratores. Os extratos secos foram solubilizados em meio ASM-1 e adicionados a frascos contendo cultivos de *M. aeruginosa* em fase exponencial de crescimento, permanecendo sob monitoramento durante nove dias. O efeito inibitório foi investigado por contagem celular, concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) e análise de microcistina-LR. O mesmo protocolo experimental foi aplicado para análise sazonal dos efeitos inibitórios, utilizando a extração hidroetanólica. Os extratos hidroetanólicos (EH) de *M. aquaticum* obtidos com coletas de outono (2016 e 2017) foram fracionados utilizando cromatografia em coluna aberta; as frações obtidas foram também avaliadas quanto à atividade inibitória. Os extratos foram analisados quanto ao teor de fenólicos totais. O efeito alelopático também foi avaliado em experimentos de inibição utilizando a espécie vegetal viva (coletada no reservatório e cultivada em laboratório) inserida em cultivo exponencial de *M. aeruginosa*, permanecendo por sete dias. Os resultados obtidos com os experimentos utilizando os extratos evidenciaram efeito inibitório sobre o crescimento celular, para ambos os extratos (aquoso - EA e hidroetanólico - EH), alcançando taxas de inibição acima de 91% na maior concentração testada (250 mg L<sup>-1</sup>). Entretanto, o EH apresentou maior inibição na concentração intermediária (10 mg L<sup>-1</sup>). Na comparação sazonal, foram verificadas taxas de inibição acima de 94,5% para as quatro estações na maior concentração (100 mg L<sup>-1</sup>). Os teores de pigmentos fotossintéticos e de microcistina-LR em geral foram compatíveis com os resultados de inibição. Para as frações obtidas das coletas de outono, a acetato de etila e a metanólica demonstraram atividades inibitórias, atingindo 97,9 e 95,0%, respectivamente. Em relação ao teor de fenólicos totais, o EH apresentou maior concentração (72,07 mg mL<sup>-1</sup>) quando comparado ao aquoso (17,40 mg mL<sup>-1</sup>); dentre as frações, acetato de etila apresentou maiores concentrações em relação à metanólica. Nos experimentos de exposição com a planta viva, houve 100% de inibição de crescimento da *M. aeruginosa* em todos os tratamentos, assim como foram observados efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos e redução da concentração de microcistina-LR. Os resultados obtidos demonstram que *M. aquaticum* apresenta propriedades alelopáticas em relação ao crescimento de *M. aeruginosa* e à produção de microcistina-LR.

**Palavras-chave:** Alelopatia. Macrófita aquática submersa. Cianobactérias. Microcistina-LR.



## ABSTRACT

KITAMURA, Rafael Shinji Akiyama. **Inhibitory activity of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutzing.** 118 f. Masters dissertation. Graduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2018

*Microcystis aeruginosa* is the one of the species of cyanobacteria that participates in the degradation of water bodies in harmful blooms. Submerged aquatic macrophyte species may present allelopathic strategies for phytoplankton control and, in this context, species of the genus *Myriophyllum* have shown potential inhibition of cyanobacteria. This study aimed to evaluate the allelopathic activity of *Myriophyllum aquaticum* on the growth and physiological aspects of *Microcystis aeruginosa*. The plant material was collected in the rio Verde reservoir (Araucária-PR) and used for the preparation of extracts, using 80% (v / v) hydroethanolic solution and water as extraction liquids. Dried extracts were solubilized in ASM-1 medium and added to flasks containing exponentially growing *M. aeruginosa* cultures, remaining under monitoring for nine days of exposure. The inhibitory effect was investigated by cellular counting, concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll-a, phycocyanin, phycoerythrin and allophycocyanin) and microcystin-LR analysis. With the same experimental protocol, the seasonal analysis of the inhibitory effects was done, using hydroethanolic extraction. The hydroethanolic extracts (EH) of *M. aquaticum* obtained with autumn collections (2016 and 2017) were fractionated using silica adsorption column chromatography; the fractions obtained were also evaluated for inhibitory activity. The extracts were analyzed for total phenolic content. The allelopathic effect was also evaluated in inhibition experiments using the living plant species (collected and cultivated in the laboratory) inserted in exponential culture of *M. aeruginosa*, remaining for seven days. The results obtained with the comparative between extracts showed an inhibitory effect on the cell growth for both extracts (aqueous - EA and hydroethanolic - EH), reaching inhibition rates above 91% in the highest concentration tested ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ). However, EH presented greater inhibition at the intermediate concentration ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). In the seasonal comparison, inhibition rates were higher than 94.5% for the four seasons at the highest concentration ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). The levels of photosynthetic pigments and microcystin-LR in general were compatible with the inhibition results. The fractions of autumn, ethyl acetate and methanol showed inhibitory activities, reaching 87,9 and 95,0%, respectively. The EA had a lower yield (8.3%) compared to HD (14.1%). In relation to the total phenolic content, the EHs presented higher concentrations ( $72,07 \text{ mg mL}^{-1}$ ) when compared to the aqueous ( $17,40 \text{ mmg mL}^{-1}$ ). In the exposure experiments with the live plant, there was 100% inhibition of *M. aeruginosa* growth in all treatments, as well as effects on photosynthetic pigments and reduction of microcystin-LR concentration. The results obtained demonstrate that *M. aquaticum* presented allelopathic properties in relation to the growth of *M. aeruginosa* and the production of microcystin-LR.

**Key words:** Allelopathy. Submerged aquatic macrophytes. Cyanobacteria. Microcystin-LR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da microcistina-LR (hepatotoxina). R1 e R3 demonstram as regiões de variação dos radicais das microcistin....	25
Figura 2. Representação esquemática dos hábitos de vida das macrófitas aquáticas: 1) Anfíbia; 2) Emergente; 3) Flutuante Fixa; 4) Flutuante livre; 5) Submersas fixas; 6) Submersas livres; 7) Epífitas. ....	30
Figura 3. Distribuição geográfica de <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc.....	35
Figura 4. Caracterização da heterofilia e hábito comportamental de <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc no ambiente. A) Esquematisação da heterofilia (WERSAL; MADSEN, 2011); B) Comportamento emergente; C) Comportamento submerso. ....	35
Figura 5. Estruturas químicas de ácido gálico, ácido elágico e Tellimagrandim II .....	36
Figura 6. Esquema representativo da Câmara de Neubauer (profundidade de 0,100 mm). A) Quadrante grande; C) quadrante médio .....	43
Figura 7. Ponto de coleta de <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc, município de Araucária, PR. ....	46
Figura 8. Esquema representativo dos procedimentos metodológicos do processo de extração dos compostos de <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc.....	48
Figura 9. Esquema representativo dos procedimentos metodológicos dos testes de inibição utilizando extratos de <i>Myriophyllum aquaticum</i> sobre <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	49
Figura 10. Quantificação de microcistina-LR: A) Cromatograma obtido a 280 nm. B) Curva de calibração analítica para a quantificação de microcistina-LR, obtida por regressão linear. ↓ indica o pico observado da microcistina-LR .....	51
Figura 11. Curva de calibração analítica para a quantificação de compostos fenólicos totais, obtida por regressão linear. ....	52
Figura 12. Fracionamentos do extrato hidroetanólico de <i>Myriophyllum aquaticum</i> .....	54
Figura 13. . Curva de calibração para a análise de fosfato total. ....	56
Figura 14. Crescimento celular de cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> ao longe de 48 dias .....	58
Figura 15. Rendimento (em %) dos extratos liofilizados de <i>M. aquaticum</i> a partir das soluções hidroetanólica e aquosa. *Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey ( $n=3$ ). ....	59
Figura 16. Comparação sazonal do rendimento dos extratos liofilizados de <i>Myriophyllum aquaticum</i> a partir das soluções hidroetanólica e aquosa ( $n=1$ ) .....	60

- Figura 17. Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso (A) e hidroetanólico (B) de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). .....61
- Figura 18. Taxa de inibição de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia (9º dia) experimental (n=3). \* indica diferença significativa (p<0,05) entre os extratos, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ....62
- Figura 19. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias de inoculação para verificação da viabilidade celular após a aplicação de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum*. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os extratos e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (n=3). .....64
- Figura 20. Concentração de compostos fenólicos totais (mg mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). \*Indica diferença significativa (p<0,05), quando comparados os extratos pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey. ....65
- Figura 21. Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após exposição a diferentes concentrações de extratos aquoso e hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os extratos e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey .....67
- Figura 22. Concentrações de pigmentos acessórios de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum*: A) Ficocianina; B) Aloficocianina; C) Ficoeritrina e; D) Ficobiliproteínas totais (n=3). \*Indica diferença significativa (p<0,05), quando comparados ao controle pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey .....68
- Figura 23. Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* após a adição de extrato hidroetanólico (80% v/v) de *Myriophyllum aquaticum* coletadas nas estações de primavera, outono, inverno e verão, em diferentes concentrações (mg L<sup>-1</sup>): 100 (A); 10 (B) e 0,1 (n=3). .....74
- Figura 24. Taxa de inibição de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ....75
- Figura 25. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias para verificação da viabilidade celular após a adição de diferentes

- concentrações de hidroetanólico 80% (de *Myriophyllum aquaticum* para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....76
- Figura 26. Comparação sazonal da concentração de compostos fenólicos totais (mg mL<sup>-1</sup>) do extrato hidroetanólico (80% v/v) de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....77
- Figura 27. Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após a inoculação de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....78
- Figura 28. Concentração de pigmentos acessórios de *Microcystisaeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum*, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição. A)Ficocina; B)aloficocianina; C)Ficoeritrina; D) Ficobiliproteínas totais (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....79
- Figura 29. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias para verificação da viabilidade celular após a aplicação de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 (A) e outono/2017 (B) (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....86
- Figura 30. Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 (A) e outono/2017 (B) para o último dia experimental (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....87
- Figura 31. Concentração de pigmentos acessórios de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 e outono/2017 para o último dia

<p>experimental. A)Ficocianina; B)Aloficocianina; C)Ficoeritrina; D) Ficoliproteínas totais (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p&lt;0,05) entre as frações e * indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....</p>	89
<p>Figura 32. Concentração de compostos fenólicos totais (mg mL<sup>-1</sup>) das frações do extrato hidroetanólico (80% v/v) de <i>Myriophyllum aquaticum</i> dos períodos de outono/2016 e outono/2017 (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p&lt;0,05) entre as frações pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....</p>	93
<p>Figura 33. Efeitos sobre o crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> em experimento de co-cultura com <i>Myriophyllum aquaticum</i>. A) Plantas advindas do reservatório do rio Verde; B) Plantas adquiridas comercialmente. TCPA+Ma: Tratamento com plantas artificiais + cultivo de <i>M. aeruginosa</i> (n=3).....</p>	95
<p>Figura 34. Representações dos dias experimentais dos experimentos de co-cultura com <i>M. aquaticum</i> proveniente do reservatório do rio Verde para inibições in vivo de <i>M. aeruginosa</i>: 1) TCP+ Ma (tratamento com planta); 2) TCPA+Ma (tratamento com planta artificial); 3) Controle. .</p>	96
<p>Figura 35. Representações dos dias experimentais dos experimentos de co-cultura com <i>M. aquaticum</i> adquiridas comercialmente para inibições in vivo de <i>M. aeruginosa</i>: 1) Controle; 2) TCPA+Ma (tratamento com planta artificial); 3)TCP+ Ma (tratamento com planta).....</p>	96
<p>Figura 36. Taxas de inibição (%) de <i>Microcystis aeruginosa</i> em experimentos de co-cultura com <i>Myriophyllum aquaticum</i> (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p&lt;0,05) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey .....</p>	97
<p>Figura 37. Concentração de clorofila-a de <i>Microcystis aeruginosa</i> após o uso de <i>Myriophyllum, aquaticum</i> em experimentos de co-cultura (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p&lt;0,05) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.....</p>	98
<p>Figura 38. Concentração de pigmentos acessórios de <i>Microcystis aeruginosa</i> após experimento de co-cultura com <i>M. aquaticum</i> (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p&lt;0,05) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.....</p>	99
<p>Figura 39. Concentração de compostos fenólicos totais (mg mL<sup>-1</sup>) de <i>Myriophyllum aquaticum</i> adquiridas comercialmente e do reservatório do rio Verde (n=3). * indica diferença significativa (p&lt;0,05) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey. ....</p>	100
<p>Figura 40. Concentração de fosfato total dos meios de cultura dos experimentos de co-cultura de <i>M. aquaticum</i> adquiridas do reservatório do rio Verde (A) e cultivadas (B) provenientes do último dia experimental (n=3).....</p>	101

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>3.1 Degradação dos corpos hídricos por eutrofização</b> .....	19
<b>3.2 Cianobactérias</b> .....	20
<b>3.3 Produção de cianotoxinas por cianobactérias e os efeitos aos organismos eucarióticos</b> .....	22
3.3.1 Microcistinas: características químicas e seus efeitos aos organismos.....	25
3.4 Métodos de controle de cianobactérias e cianotoxinas .....	26
<b>3.5 Macrófitas aquáticas e a importância nos ecossistemas aquáticos</b> .....	29
<b>3.6 Efeito dos aleloquímicos de macrófitas aquáticas sobre as cianobactérias</b> .....	31
3.6.1 <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc. ....	34
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	41
5.1 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	41
<b>5.2 Parâmetros de monitoramento para <i>M. aeruginosa</i></b> .....	42
5.2.1 Equipamentos utilizados .....	42
5.2.2 Determinação de concentração celular.....	43
5.2.3 Determinação de clorofila-a .....	44
5.2.4 Determinação de pigmentos acessórios .....	45
<b>5.3 Ensaio de inibição com extratos de <i>Myriophyllum aquaticum</i> sobre <i>Microcystis aeruginosa</i>: comparação entre diferentes soluções extratoras</b> .....	46
5.3.1 Coleta de amostras vegetais de <i>M. aquaticum</i> .....	46
5.3.2 Obtenção dos extratos de <i>M. aquaticum</i> .....	47
5.3.3 Experimentos de exposição de células cultivadas de <i>M. aeruginosa</i> a extratos de <i>M. aquaticum</i> (“ensaio de inibição”) .....	48
5.3.4 Teste de viabilidade celular.....	50
5.3.5 Análise de Microcistina-LR.....	50
5.3.6 Análise de Compostos fenólicos dos extratos vegetais .....	52
<b>5.4 Comparação sazonal dos efeitos do extrato hidroetanólico de <i>M. aquaticum</i> sobre <i>M. aeruginosa</i></b> .....	53
<b>5.5 Fracionamento do extrato hidroetanólico de <i>M. aquaticum</i></b> .....	53

5.6	<b>Ensaio de inibição de <i>M. aeruginosa</i> em experimentos de co-cultura com <i>M. aquaticum</i> (experimentos “<i>in vivo</i>”)</b> .....	55
5.7	<b>Análises dos dados</b> .....	57
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
6.1	<b>Cinética de crescimento de <i>M. aeruginosa</i></b> .....	58
6.2	<b>Rendimentos dos extratos de <i>M. aquaticum</i></b> .....	59
6.3	<b>Exposição de cultivo de <i>M. aeruginosa</i> a extratos de <i>M. aquaticum</i></b> .....	61
6.3.1	Efeitos no crescimento e viabilidade celular de <i>M. aeruginosa</i> .....	61
6.3.2	Concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de <i>M. aquaticum</i> ...	64
6.3.3	Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos.....	66
6.3.4	Efeitos na concentração de microcistina-LR .....	70
6.4	<b>Comparação sazonal dos efeitos inibitórios do extrato hidroetanólico de <i>M. aquaticum</i></b> .....	72
6.4.1	Efeitos no crescimento celular e na viabilidade de <i>M. aeruginosa</i> .....	73
6.4.2	Concentração de compostos fenólicos totais dos extratos hidroetanólicos de <i>M. aquaticum</i> . .....	76
6.4.3	Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos.....	78
6.4.4	Efeitos na concentração de microcistina-LR .....	80
6.5	<b>Efeitos das frações do extrato hidroetanólico sobre <i>M. aeruginosa</i></b> .....	83
6.5.1	Efeitos no crescimento e viabilidade celular de <i>M. aeruginosa</i> .....	83
6.5.2	Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos.....	87
6.5.3	Efeitos das frações sobre a concentração de microcistina-LR .....	91
6.5.4	Concentração de compostos fenólicos totais das frações do extrato hidroetanólico de <i>M. aquaticum</i> .....	93
6.6	<b>Atividade inibitória sobre <i>M. aeruginosa</i> em experimento de co-cultura utilizando <i>M. aquaticum</i></b> .....	95
6.6.1	Efeitos no crescimento celular <i>M. aeruginosa</i> .....	95
6.6.2	Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos.....	98
6.6.3	Concentração de compostos fenólicos totais de <i>M. aquaticum</i> .....	99
6.6.4	Comparação da concentração de fósforo total .....	101
6.6.5	Efeitos sobre a microcistina-LR.....	102
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	104
9	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	106
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

A gestão de qualidade dos corpos hídricos é de relevância mundial para a proteção e preservação da biodiversidade, equilíbrios ecossistêmicos e de saúde pública. Entretanto, com o crescente aumento das atividades antrópicas, como as agrícolas e industriais, ocorrem impactos negativos e consequente degradação dos corpos hídricos (MENNAA et al., 2015; ZHOU; TU; XU, 2015). Além disso, as alterações climáticas globais, o aumento de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera e o despejo de fertilizantes e esgotos domésticos têm contribuído para o aumento da incidência de eutrofizações em ambientes aquáticos, visto que há um acréscimo das concentrações de nitrogênio e fósforo (HE et al., 2015; OTTEN; PAERL, 2015; QIN et al., 2015; YAN et al., 2016).

Os processos de eutrofização são uma preocupação ambiental, necessitando de atenção quando ocorre a proliferação de cianobactérias no ambiente (TOUZET et al., 2016). As florações de cianobactérias causam efeitos indesejáveis nos ecossistemas aquáticos, pois podem alterar a estrutura trófica e a funcionalidade local, devido à desoxigenação da coluna d'água (CATHERINE et al., 2013; LU et al., 2017; PAERL; OTTEN, 2013) e à produção de cianotoxinas. As cianotoxinas podem causar o decréscimo da biodiversidade, mortalidade de organismos, citotoxicidade, fitotoxicidade, além de problemas à saúde humana (CATHERINE et al., 2013; CORBEL et al., 2015; KAMINSKI et al., 2015; PAERL; OTTEN, 2013; PAKDEL et al., 2013; QIN et al., 2015; ROMERO-OLIVA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2013).

*Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias mais comuns que estabelece florações em reservatórios e em outros corpos hídricos, degradando-os, principalmente pela produção de microcistinas (KUDELA et al., 2015; LI et al., 2016). As microcistinas fazem parte do grupo das cianotoxinas hepatotóxicas, e são de preocupação para a saúde humana (PEKAR et al., 2016; PUDDICK et al., 2013; ZHOU; TU; XU, 2015), pois estão associadas a tumores e outros episódios de intoxicação (KUDELA et al., 2015).

Os problemas ecológicos, estéticos e econômicos que são gerados pelas florações de cianobactérias, são comumente tratados pela aplicação de algicidas convencionais, por meio da adição de compostos químicos, tais como:



permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e flocculantes anti-algas, os quais são de rápida eficiência e aplicação (BARROS et al., 2011). Entretanto, alguns desses compostos apresentam persistência ambiental e potencial para gerar poluentes secundários (HUANG et al., 2016; MENG et al., 2015), o que exige a busca por tecnologias econômica e ambientalmente viáveis.

As macrófitas submersas são importantes para a manutenção da qualidade de lagos, visto que estas competem com o fitoplâncton por luz e nutrientes, reduzem os sedimentos em suspensão, contribuem na purificação da água e, conseguem inibir diretamente o crescimento de cianobactérias por alelopatia (HUANG et al., 2016; PAKDEL et al., 2013; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014). A alelopatia consiste no efeito positivo ou negativo que um organismo exerce sobre outros pela liberação de compostos no ambiente, denominados de aleloquímicos (HUANG et al., 2016; PAKDEL et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que os aleloquímicos podem ser uma alternativa viável para o combate de florações de cianobactérias, pois estes são biodegradáveis e, dependendo da concentração aplicada, não apresentam toxicidade ao ambiente (HUANG et al., 2016; MENG et al., 2015). Dentre os experimentos testados, estão a aplicação de extratos de espécies de macrófitas como *Potamogeton pectinatus*, *Ceratophyllum demersum* e *Sagittaria trifolia*, as quais demonstraram eficiência no combate ao crescimento de cianobactérias, principalmente de *Microcystis aeruginosa* (GHOBRIAL; NASSSR; CAMIL, 2015; LI et al., 2016; MENG et al., 2015; PAKDEL et al., 2013; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014), além da aplicação de macrófitas vivas em experimento de co-cultura para averiguar o potencial inibitório sobre as cianobactérias (CHENG et al., 2008; WANG et al., 2017).

Deste modo, o intuito da presente pesquisa foi avaliar a atividade inibitória de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc sobre *Microcystis aeruginosa*. Visto que as macrófitas submersas contribuem para a manutenção dos ecossistemas aquáticos devido à liberação de aleloquímicos, a presente pesquisa visa compreender a atividade inibitória desta macrófita sobre o crescimento da espécie de cianobactéria em estudo, bem como averiguar os aspectos fisiológicos, tanto em experimentos com extratos, quanto com as macrófitas vivas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito inibitório da macrófita *Myriophyllum aquaticum* sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, considerando aspectos fisiológicos em experimentos utilizando extratos e mediante exposição com a planta viva.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos sobre o crescimento celular de *M. aeruginosa*, teor de pigmentos fotossintéticos e a produção de microcistina-LR;
- Verificar a influência da sazonalidade em relação ao efeito inibitório, utilizando extratos hidroetanólicos de *M. aquaticum*;
- Investigar a bioprospecção preliminar de um extrato hidroetanólico, através da atividade inibitória de frações obtidas por diferenças de polaridade;
- Determinar os teores de compostos fenólicos dos extratos e frações obtidas de *M. aquaticum*;
- Avaliar o potencial alelopático de *M. aquaticum* em experimentos de exposição da planta viva ao cultivo de *M. aeruginosa*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Degradação dos corpos hídricos por eutrofização

A degradação dos corpos hídricos pelas atividades antrópicas tem gerado diversos distúrbios, tais como: perda da biodiversidade, alteração dos ciclos biogeoquímicos, aumento do número de espécies invasoras, degradação sanitária, além de prejuízos econômicos e sociais (ESTEVES, 2011; TUNDISI, 2013; TUNDISI; TUNDISI, 2011). Dentre as consequências dessas atividades estão os processos de eutrofização, caracterizados principalmente pelo acréscimo excessivo de nitrogênio e fósforo (CARNEIRO et al., 2014; PAKDEL et al., 2013; SOLIS et al., 2016; YAN et al., 2016) a partir de fontes pontuais ou não pontuais (TUNDISI; TUNDISI, 2011).

Os processos de eutrofização podem ser classificados em: naturais ou antrópicos (CARNEIRO et al., 2014; ESTEVES, 2011). A eutrofização natural consiste no acréscimo de nutrientes com dependência dos processos naturais, que pode demorar cerca de milhares de anos para ocorrer. Tal processo permite a caracterização do grau de trofia dos ambientes aquáticos (CARNEIRO et al., 2014; ESTEVES, 2011). Já a eutrofização antrópica ou cultural é causada principalmente pela adição de nutrientes por ações tais como despejo de esgotos domésticos e industriais, além de fertilizantes, o que propicia a aceleração do enriquecimento de corpos hídricos no ambiente, quando comparados ao processo natural (CARNEIRO et al., 2014; ESTEVES, 2011; TUNDISI; TUNDISI, 2011).

Como características de processos de eutrofização, principalmente antrópica, é possível observar alterações no ambiente, como: elevado desenvolvimento de macrófitas aquáticas, florações de algas e cianobactérias, desregulação dos graus de balanços tróficos nos ecossistemas, redução da transparência da água, geração de sulfeto de hidrogênio, morte de peixes e outros organismos aquáticos, além de desequilíbrios nos ciclos biogeoquímicos (CARNEIRO et al., 2014; HEISLER et al., 2008; PAKDEL et al., 2013).

Os processos de eutrofização, juntamente com a formação de florações de cianobactérias, podem reduzir a diversidade de espécies de fitoplâncton nos

sistemas aquáticos (RANGEL et al., 2016; TOUZET et al., 2016). Além disso, podem ocorrer interferências na saúde humana, devido ao crescimento de florações com produção e liberação de toxinas, principalmente de contaminação das águas associadas à recreação e ingestão (ZHANG et al., 2016; QIAN et al., 2009).

Tais fatos demonstram a necessidade de redução dos impactos que propiciam os processos de eutrofização, bem como a contribuição destes, para a ocorrência de florações de cianobactérias com potenciais de produção de toxinas.

### **3.2 Cianobactérias**

As cianobactérias são organismos fotossintéticos, procarióticos, autotróficos, aeróbios e são considerados um dos grupos ancestrais do planeta (HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016; HE et al., 2015; RAVEN, 2014). A proliferação durante a Era Pré-cambriana (3,5 Bilhões de ano) destes organismos permitiu a alteração da biosfera anóxica, o que possibilitou a evolução das plantas terrestres e a vida animal fora do ambiente aquático devido à produção de oxigênio (HAMILTON; BRYANT; MACALADY, 2016;; RAMANAN et al., 2016; RAVEN, 2014).

As cianobactérias são consideradas um dos grupos que mais contribui para a produção primária nos oceanos (SHARMA; RAI; STAL, 2013). Isso é possível, pois estes organismos realizam fotossíntese e produzem oxigênio, visto que possuem clorofila e fotossistemas I e II. São as únicas que apresentam ficobilissomos, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina como pigmentos acessórios (RAMANAN et al., 2016; RAVEN, 2014; REVIERS, 2006), os quais contribuem para a absorção de luz e transferência de elétrons no processo de fotossíntese, permitindo sua existência, mesmo em regiões com menores intensidades de luz (MADIGAN et al., 2012; RAVEN, 2014).

Como forma de adaptação às diferenças na radiação solar e disponibilidade de nutrientes na coluna d'água, as cianobactérias conseguem regular a profundidade em que estão presentes por meio de vacúolos gasosos, que é uma das características deste grupo (RAVEN, 2014; SHARMA; RAI; STAL, 2013).

Algumas espécies de cianobactérias apresentam a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico devido à presença de células denominadas heterocistos. O

ambiente redutor formado dentro dessas células permite que a enzima nitrogenase atue e realize o processo de fixação de nitrogênio (HUDNELL; LAJTHA; PAOLETTI, 2008; RAVEN, 2014; SHARMA; RAI; STAL, 2013).

Este grupo está presente em habitats variados, seja em reservatórios, lagos, oceanos, rios, em rochas do Ártico, em lagos e rochas na Antártica, cinzas vulcânicas, e temporariamente, até mesmo em rochas no deserto, o que permite a verificação de uma distribuição mundial do grupo (HE et al., 2015; KAMINSKI et al., 2015; REVIERS, 2006; RIOS et al., 2007; SHARMA; RAI; STAL, 2013).

Alterações climáticas globais, o aumento de temperatura, emissões de CO<sub>2</sub>, alterações de cursos hidrológicos, enriquecimento de nutrientes por despejos de esgotos domésticos e industriais, são alguns dos fatores que contribuem para os processos de eutrofização e, conseqüentemente, para a proliferação exacerbada e formação de florações de cianobactérias no ambiente (O'NEIL et al., 2012; OTTEN; PAERL, 2015; PAERL; QIN et al., 2015).

A proliferação desordenada de cianobactérias usualmente causa prejuízos econômicos, riscos para a biota aquática, para organismos terrestres e para a saúde humana, principalmente pelo decréscimo na qualidade das águas, devido à liberação de cianotoxinas (CATHERINE et al., 2013; HEISLER et al., 2008; LI et al., 2016; MENG et al., 2015; PANTELIC et al., 2013; RANGEL et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2013).

O gênero *Microcystis* é um dos mais comuns nas florações, e pode aparecer como colônias, em aglomerados de milhares de células envoltas por uma matriz mucilaginosa (LI et al., 2016; WICHELEN et al., 2016). Dentro deste gênero, a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta distribuição cosmopolita, e é amplamente citada em processos de florações e produção de cianotoxinas, principalmente microcistinas (GHOBRIAL; NASSR; KAMIL, 2015; LI et al., 2016; ROMERO-OLIVA et al., 2015; WICHELEN et al., 2016).

Por isso, há a necessidade da melhor compreensão das cianotoxinas produzidas, bem como os efeitos das mesmas, frente ao ambiente e à saúde humana.

### 3.3 Produção de cianotoxinas por cianobactérias e os efeitos aos organismos eucarióticos

As cianotoxinas, que podem se diversificar quanto à sua estrutura química e toxicidade, podem ser produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias (O'NEIL et al., 2012; ZHOU et al., 2015), como: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Scytonema*, *Hapalosiphon*, *Tolypothrix* e *Lyngbya* (TUNDISI; MATSUMURA, 2012).

As cianotoxinas são metabólitos secundários que podem ser classificadas por suas características químicas, como peptídeos, alcaloides e lipopolissacarídeos (PANTELIC et al., 2013; SHARMA; RAI; STAL, 2013). Estes compostos são produzidos dentro das células das cianobactérias e sua liberação ocorre principalmente quando há lise celular (PANTELIC et al., 2013; WOOD, 2016). Também podem ser classificadas em relação aos seus efeitos sobre os organismos eucarióticos: hepatotoxinas (fígado), neurotoxinas (sistema nervoso), citotoxinas (metabolismo celular) e dermatotoxinas (pele) (MEREL et al., 2013; PANTELIC et al., 2013; QIN et al., 2015; SHARMA; RAI; STAL, 2013; ZHOU; TU; XU, 2015).

As hepatotoxinas são um grupo de peptídeos cíclicos que inibem as proteínas fosfatases PP1 e PP2A em hepatócitos, que podem levar à hemorragia hepática em casos agudos, assim como atuarem como promotores de tumores (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; PHAM et al., 2015; SHARMA; RAI; STAL, 2013). Esta classe inclui cerca de 90 variantes de microcistinas, 9 de nodularinas e 3 variantes de cilindrospermopsinas (MEREL et al., 2013; HUDNELL; LAJTHA; PAOLETTI, 2008; O'NEIL et al., 2012).

A contaminação dos corpos hídricos pelas cianotoxinas tem sido um potencial problema para oceanos, lagos, rios e até mesmo ambientes terrestres devido aos riscos e danos gerados frente à saúde humana e ambiental (CORBEL et al., 2015; KUDELA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2013; ZHOU et al., 2015). Alguns dos efeitos gerados pelas cianotoxinas nos diferentes tipos de organismos, estão representados no quadro 1.

**Quadro 1. Estudos que demonstram testes realizados com diferentes organismos vivos e os efeitos das cianotoxinas hepatotóxicas nos mesmos.**

Cianotoxina	Organismo testado	Efeitos no organismo	Autores/ano
<b>Microcistina</b>	Peixe ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Mutagênese	(VASCONCELOS et al., 2013)
	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) e alface ( <i>Lactuca sativa</i> )	Inibição de germinação	(CORBEL et al., 2015)
	Bivalve ( <i>Corbicula leana</i> )	Estresse oxidativo	(PHAM et al., 2015)
	Rato (Células cerebrais)	Indução da pró-apoptose, efeitos pró-inflamatórios em macrófagos e células neurais.	(TAKSER et al., 2016)
	Peixe ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Lesões musculares, apoptoses celulares, danos nos tubos proximais e distais, danos em hepatócitos.	(FISCHER; DIETRICH, 2000)
	Peixe ( <i>Oreochromis</i> sp.)	Estresse oxidativo.	(PRIETO et al., 2006)
<b>Cilindrospermopsinas</b>	Rato (Células cerebrais)	Indução da pró-apoptose, efeitos pró-inflamatórios em macrófagos e células neurais.	(TAKSER et al., 2016)
	Humano (Células CACO-2)	Estresse oxidativo e alterações morfológicas celulares, degeneração de lipídeos, danos mitocondriais.	(GUITIÉRREZ-PRAENA et al., 2012)
<b>Anatoxina-a</b>	Rato (Células cerebrais)	Indução da pró-apoptose, efeitos pró-inflamatórios em macrófagos e células neurais.	(TAKSER et al., 2016)

A liberação de cianotoxinas nas águas de consumo, principalmente por meio da ingestão direta, tem gerado diversos problemas de saúde pública (CORBEL et al., 2015; KUDELA et al., 2015; MEREL et al., 2013; QIN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Dentre alguns exemplos mundiais, está a intoxicação e hospitalização de 100 pacientes na Ilha Palm (MEREL et al., 2013), e no reservatório Armidale, na Austrália, por *Microcystis aeruginosa* (PANTELIC et al., 2013); foi registrada elevada incidência de câncer na China, o que tem sido atribuído à ingestão de água contaminada com cianotoxinas, visto que nas regiões em estudo foram registradas florações com produção de toxinas no ambiente (PANTELIC et al., 2013).

Para a região da América do Sul, conforme um levantamento de literatura realizado por Dorr et al. (2010), foi constatada a presença de microcistinas e florações de cianobactérias em: atividades de aquicultura na Colômbia, além de lagoas costeiras, estuários e lagos de consumo humano; no Chile, na região de Concepción, ocorreu uma floração de *Microcystis* sp. no ano de 1988; no Uruguai, foram observadas florações em rios, reservatórios, lagos, lagoas costeiras e estuários; e na Venezuela foram observados casos restritos em reservatórios e lagos. Em todas essas localidades foram registradas espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Cilindrospermopsis*, como os mais abundantes nos processos de florações. Gianuzzi et al. (2011) relata que na Argentina foram registrados *blooms* de *M. aeruginosa* com produção de microcistina, além de casos de intoxicação no Salto Grande Dam em janeiro de 2007.

Para o Brasil, o principal caso em destaque foi o ocorrido na cidade de Caruaru, em 1996, no qual 52 pacientes de tratamento de hemodiálise morreram devido à contaminação da água utilizada na aplicação do tratamento, caso conhecido principalmente pela verificação da ação direta das cianotoxinas no organismo, em especial, por microcistinas (AZEVEDO et al., 2002). Após esse incidente, o país foi o primeiro a adotar medidas de controle de qualidade de água e, posteriormente, foi implantada a portaria n°. 2914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, que prevê o controle mensal de cianobactérias e concentração máxima de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de microcistinas em águas para o abastecimento público (BRASIL, 2011).

No estado do Paraná estudos têm demonstrado a ocorrência de florações com a liberação de toxinas em locais de abastecimento de água pública (SANTOS; BRACARENSE, 2008), onde que a concentração de microcistinas nas águas apresentou-se acima do que é permitido pela legislação. Em um estudo realizado por Hirooka et al. (1999) no período de 1995-1996, foi constatado a presença de *Microcystis aeruginosa* nas 50 amostras realizadas em cinco regiões do estado, sendo registrados valores de 0,2 a  $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$  de microcistina nas águas analisadas da região de Itaipu. Kamogae et al. (2006), verificaram a presença de microcistina e de cianobactérias para 56 amostras, na região do norte do estado principalmente para as áreas de intensa atividade agrícola no período de 1999-2000, com registro de 0,134 a  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  de microcistina em rios da região.

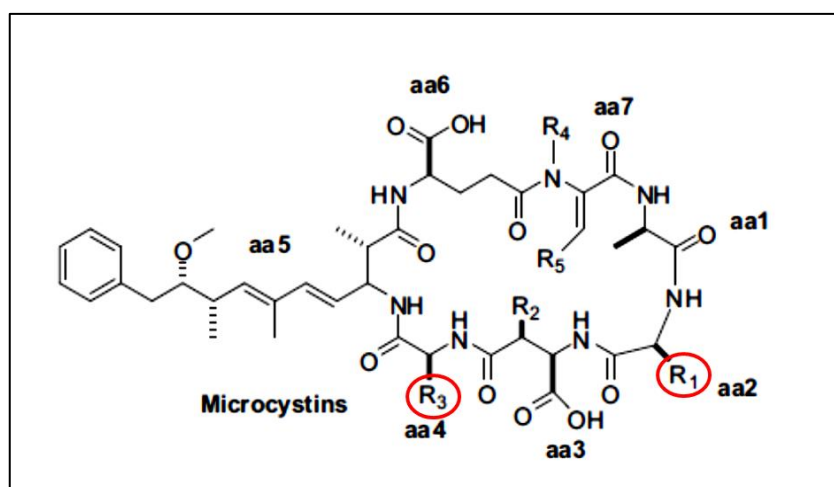


As microcistinas (hepatotoxinas) são as cianotoxinas mais estudadas, principalmente devido à toxicidade apresentada frente aos organismos. As cianobactérias que conseguem produzi-las apresentam distribuição cosmopolita. Além disso, as espécies produtoras de microcistinas são mais comuns em florações quando há processos de eutrofização (CORBEL et al., 2015; HUDNELL; LAJTHA; PAOLETTI, 2008; SHARMA; RAI; STAL, 2013; SOLIS et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2013).

### 3.3.1 Microcistinas: características químicas e seus efeitos aos organismos

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos (Fig. 1) e apresenta cerca de 90 variantes. Sua molécula compreende uma estrutura cíclica (aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7), sendo que: aa1= D-alanina; aa2=L-aminoácidos variáveis ( $R_1$ ); aa3= D-eritro- $\beta$ -metil-aspártico ou D-ácido aspártico; aa4= aminoácidos variáveis ( $R_3$ ); aa5= (2S,3S,8S,9S-3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda); aa6= D-ácido glutamâmico; aa7= N-metil-dehidrolanina. A variação entre os radicais aa2 e aa4 permite a classificação das diferentes variantes de microcistinas (DOOR et al., 2010; PUDDICK et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

**Figura 1. Estrutura química da microcistina-LR (hepatotoxina).  $R_1$  e  $R_3$  demonstram as regiões de variação dos radicais das microcistinas.**



Fonte: Adaptado de Door et al. (2010)

A presença de  $\beta$ -aminoácidos (Adda) é uma das características marcantes das microcistinas, visto que são estruturas associadas com sua hepatotoxicidade. A presença de tal aminoácido aumenta a hidrofobicidade geral da molécula (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; SANTOS; BRACARENSE, 2008).

O fígado é o órgão alvo das microcistinas e, estudos *in vitro* têm demonstrado os efeitos citotóxicos da microcistina-LR em células humanas como eritrócitos, linfócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (SANTOS; BRACARENSE, 2008). As variantes LR, YR e RR apresentam potencial para a inibição da atividade de fosfatases PP1 e PP2a presentes nas membranas de hepatócitos (GIANUZZI et al., 2011; KAMOGAE; HIROOKA, 2000; SANTOS; BRACARENSE, 2008). A inibição da atividade de fosfatases aumenta a fosforilação de proteínas nos hepatócitos e interferem na expressão do gene responsável pelo crescimento celular. Além disso, tal fato altera os microfilamentos e resulta na perda de suporte celular, o que pode levar a apoptose das células (KAMOGAE; HIROOKA, 2000). A destruição da arquitetura tecidual do fígado promove em minutos ou horas, o choque hipovolêmico e leva a insuficiência hepática em algumas horas ou dias (SANTOS; BRACARENSE, 2008).

Diante de tais fatos, há a necessidade de desenvolvimento de métodos eficazes para o controle e tratamento de locais contaminados por cianotoxinas, principalmente referentes à microcistinas.

### **3.4 Métodos de controle de cianobactérias e cianotoxinas**

Várias metodologias para a prevenção e controle de florações de cianobactérias têm sido testadas por meio da aplicação de tratamentos físicos, químicos e biológicos (BARROS et al., 2011; XU et al., 2007). Entretanto, os processos convencionais como coagulação-floculação e clarificação, não são efetivos na remoção de cianobactérias e cianotoxinas (SANTOS; BRACARENSE, 2008), o que demanda a busca por métodos alternativos de tratamentos.

Métodos químicos podem inibir o crescimento ou causar a morte (lise celular) das cianobactérias. Dentre os compostos utilizados, o sulfato de cobre é um algicida eficaz, pois causa rupturas de tilacóides das cianobactérias, agregação de

fibrilas de DNA e a morte das células (QIAN et al., 2010). Estudos com pré-tratamentos de pré-oxidação, como a utilização de ozônio e permanganato podem remover e reduzir a quantidade de cianobactérias em escalas pilotos (WANG et al., 2015).

O uso de processos avançados de oxidação são tecnologias que demonstram ser eficazes, devido à geração de radicais reativos e contribuem na morte de cianobactérias e degradação de cianotoxinas (HE et al., 2015). Dentre esses processos, a utilização de peróxido de hidrogênio é visto como uma possibilidade de aplicação, pois não é bioacumulado no ambiente, pode ser decomposto rapidamente por processos biológicos, químicos e mecanismos fotoquímicos. Além disso, o tratamento mostra-se eficaz devido à redução de cianobactérias e da concentração de cianotoxinas no ambiente (BARRINGTON; REICHWALDT; GHADOUANI, 2013; QIAN et al., 2010)

Outra técnica utilizada são os métodos eletroquímicos e estes demonstram que o processo de eletrólise pode inibir o crescimento de cianobactérias e são eficientes (aproximadamente 91% de inibição) no tratamento aplicado (XU et al., 2007). Como síntese de informações e melhor compreensão de possíveis tratamentos físicos e químicos eficazes, o Quadro 2 retrata algumas das principais técnicas utilizadas no tratamento e combate de cianobactérias e cianotoxinas.

Entretanto, apesar da eficiência dos métodos físicos e químicos, muitos tratamentos utilizados podem gerar produtos danosos ao ambiente, acumulação de metais nos ecossistemas e geração de poluentes secundários, além de serem ineficazes no processo de remoção de cianotoxinas (BARRINGTON, REICHWALDT; GHADOUANI, 2013; HUANG et al., 2016; MENG et al., 2015). Por isso, para a aplicação de tratamentos contra cianobactérias e cianotoxinas, há a necessidade de buscas por tecnologias eficazes, além de econômica e ambientalmente viáveis (WANG et al., 2015).

Estudos com algicidas biológicos ou derivados de organismos vivos têm sido mais frequentes, principalmente por serem tratamentos que apresentam redução de custos e serem eficazes. Além disso, essas técnicas promovem menor geração de impactos negativos ao ambiente (BARROS et al., 2011; LI et al., 2016).

**Quadro 2. Efetividade e problemáticas de tratamentos para inibição de cianobactérias e cianotoxinas.**

Tratamento	Efetividade	Problemáticas
Pré-ozonização	Processo auxiliar de remoção celular	Liberação de substâncias tóxicas. Dependência de pH e tempo
Pré-cloração	Remoção de cianotoxina extracelular de ~100%. Efetivo para remoção de microcistinas, saxitoxinas	Não é efetivo com doses inferiores a 0,5 mg L <sup>-1</sup> ou pH>8
Coagulação	Remoção de >90% de células e <10% de cianotoxinas	Não há remoção efetiva de cianotoxinas
Coagulação – Oxidação ferrosa	Remoção >93% de cianotoxinas.	A eficiência depende da dosagem de ferro, pH e tempo de contato
Flotação de ar dissolvido	Remoção de 40-80% das células e cianotoxinas internas.	Cianotoxinas extracelulares não são removidas
Filtração lenta de área	Remoção de cianotoxinas intracelulares (<86%).	Combinação com outros tratamentos não é eficaz. Necessidade de processos de coagulação posteriormente
Filtração rápida	Remoção de >60% de cianotoxinas intracelulares. Remoção de <10% de cianotoxinas extracelulares	Combinação com outros tratamentos não é eficaz. Necessidade de processos de coagulação posteriormente
Processos de membrana	Remoção >96% de cianotoxinas intracelulares e células.	Depende da membrana utilizada. Não remove cianotoxinas extracelulares. Dependência de outros métodos de tratamentos.
Adsorção por pó de carvão ativado	Remoção de >85% de cianotoxinas extracelulares	Variação de eficiência de tratamento. Decréscimo de eficiência com o tempo
Adsorção por carbono ativado granular	Remoção de >60% de cianotoxinas intracelulares e células. Remoção de >95% de cianotoxinas extracelulares	Competição com COD pode reduzir eficiência.
Ozonização	Remoção >98% de cianotoxinas extracelulares	Ozônio é corrosivo e tóxico e requer manutenção e atenção.
Radiação UV	Não viável	Geração de compostos perigosos, necessidade altas doses de UV para ocorrer degradação.
Dióxido de titânio	Remoção de 100% de cianotoxinas extracelulares.	Dependente do pH e influenciado por UV nas concentrações iniciais.
Fotocatálise de Fe	Remoção de 100% de cianotoxinas extracelulares.	Fe residual no ambiente pode ser problema.
Fenton e Foto-fenton	Remoção de 60-100% de cianotoxinas extracelulares	Depende da concentração dos reagente e pH, além do tempo exposto a UV, para sua eficiência.
Sonólises	Remoção significativa de células sem ocorrer lise celular	Não há remoção de cianotoxinas extracelulares
Biodegradação	Remoção de 100% de cianotoxinas extracelular	Poucas cepas estudadas são capazes de degradar.

Fonte: Adaptação de PANTELIC et al., (2013).

Neste contexto, dentre as pesquisas realizadas por processos biológicos, observa-se que a utilização de aleloquímicos derivados de macrófitas aquáticas têm sido eficazes para a inibição de crescimento de cianobactérias e degradação de cianotoxinas (LI et al., 2016; MENG et al., 2015; PAKDEL et al., 2013; WANG et al.,

2016; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014). Essa técnica apresenta-se vantajosa, principalmente pela biodegradabilidade dos compostos e, dependendo da concentração aplicada, não há toxicidade frente ao ambiente (HUANG et al., 2016; MENG et al., 2015), tornando-a um grande potencial para estudos e aplicações. Além disso, pode-se utilizar tanto a macrófitas viva, quanto o uso de extratos para que seja obtida eficiência na inibição das cianobactérias, tornando a técnica ainda mais relevante.

### 3.5 Macrófitas aquáticas e a importância nos ecossistemas aquáticos

As macrófitas são organismos aquáticos que ocorrem em ambientes sazonal ou permanentemente inundados (PADIAL; BINI; THOMAZ, 2008). Consistem em produtoras primárias e são elementos chaves dos corpos hídricos, pois podem servir de habitat e alimentação para outros organismos. Tal aspecto demonstra a importância frente às cadeias tróficas e na estruturação dos nichos ecológicos (BORNETTE; PUJALON, 2011; EBKE; FELTEN; DOREN, 2013; ESTEVES, 2011; THOMAZ et al., 2015).

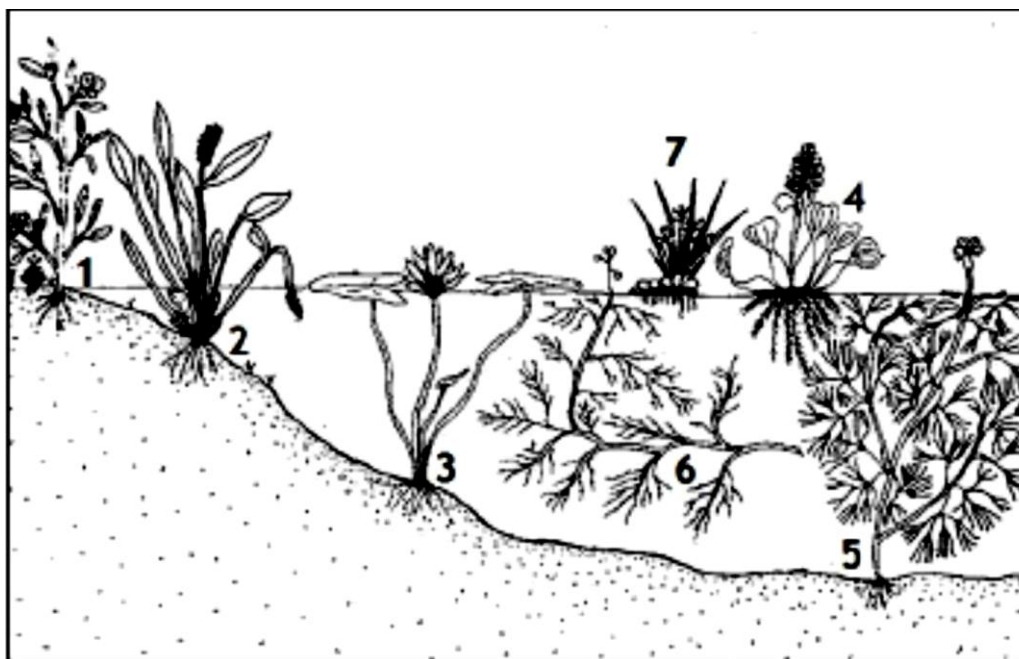
Esses organismos são capazes de colonizar diferentes tipos de ambientes (lagos, lagoas, *wetlands*, rios, reservatórios, corredeiras e bromélias), e apresentam características de adaptações limnológicas, por meio da plasticidade apresentada (ANDRADE et al., 2015; PADIAL; BINI; THOMAZ, 2008).

Conforme Pott e Pott (2000) e Andrade et al.(2015), as macrófitas aquáticas podem ser classificadas pelos diferentes hábitos de vida apresentados ou as formas biológicas que estas assumem (Fig. 2), sendo denominadas:

- Anfíbia ou semi-aquática: macrófitas com a capacidade de viver em áreas alagadas e ambientes terrestres.
- Emergente: macrófitas enraizadas no substrato com partes submersas e outras fora d'água.
- Flutuantes Fixas: macrófitas enraizadas no substrato com caules e/ou ramos e/ou folhas flutuantes.

- Flutuantes livres: macrófitas não-enraizadas no substrato, com caules e/ou ramos e/ou folhas flutuantes e podem ser transportadas pelo vento e/ou por animais
- Submersas fixas: macrófitas enraizadas no substrato e apresentam caules e folhas submersas, e apresentam frequentemente flores para fora da água.
- Submersas livres: macrófitas não enraizadas no substrato, totalmente submersas e apresentam flores emersas.
- Epífitas: macrófitas que se instalam sobre outras plantas aquáticas.

**Figura 2. Representação esquemática dos hábitos de vida das macrófitas aquáticas: 1) Anfíbia; 2) Emergente; 3) Flutuante Fixa; 4) Flutuante livre; 5) Submersas fixas; 6) Submersas livres; 7) Epífitas.**



Fonte: (POTT; POTT, 2000).

As macrófitas aquáticas contribuem diretamente nos processos biológicos, físicos e químicos dentro de um ecossistema. Quanto aos aspectos físicos, constata-se interferência desses organismos frente à velocidade e fluxo de ecossistemas aquáticos, ações indiretas nas características do sedimento, ressuspensão de sólidos e contribuição na aeração do ambiente pela liberação de gases, como o oxigênio (BORNETTE; PUJALON, 2011; ESTEVES, 2011; FRANKLIN; DUNBAR; WHITEHEAD, 2008). Quanto aos aspectos químicos, há as alterações nos ciclos biogeoquímicos, principalmente referente a nitrogênio, fósforo e carbono

(BORNETTE; PUJALON, 2011; FRANKLIN; DUNBAR; WHITEHEAD, 2008; POMPÊO, 2008).

Quanto aos aspectos biológicos constata-se que, além de serem responsáveis pelas contribuições nos nichos ecológicos dos ecossistemas aquáticos, as macrófitas corroboram para a manutenção da qualidade das águas (QIMING et al., 2006; WANG et al., 2015). As macrófitas aquáticas submersas apresentam grande contribuição neste processo, pois são responsáveis por oxigenação do ambiente e contribuição na transparência, além de controlar o desenvolvimento das comunidades fitoplanctônicas, principalmente, pela liberação de aleloquímicos que corroboram na prevenção e redução do crescimento de florações de cianobactérias por meio de alelopatia (HUANG et al., 2016; PAKDEL et al., 2013; QIMING et al., 2006; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

Devido ao registro de poucos estudos referente à ecologia das macrófitas aquáticas (principalmente brasileiras), dos efeitos e contribuições que esses organismos podem realizar frente ao ambiente (PADIAL; BINI; THOMAZ, 2008; PÔMPEO, 2008), há a necessidade de pesquisas relacionadas a bioprospecção das espécies referente a estes aspectos, principalmente acerca das potencialidades de aplicações e soluções de problemas, como a contribuição na redução e prevenção da formação de florações de cianobactérias.

### **3.6 Efeito dos aleloquímicos de macrófitas aquáticas sobre as cianobactérias**

As macrófitas apresentam potenciais alelopáticos nos ecossistemas aquáticos e desenvolvem importante papel na restauração de lagos eutrofizados, devido à atuação no controle de florações por cianobactérias por alelopatia (GHOBRIAL; NASSR; KAMIL, 2015; HONG et al., 2008; PAKDEL et al., 2013; QIMING et al., 2006). A alelopatia é o efeito inibitório de um organismo sobre outros pela liberação de compostos denominados de aleloquímicos (GHOBRIAL; NASSR; KAMIL, 2015; HUANG et al., 2016; HONG et al., 2008b; PAKDEL et al., 2013).

Os aleloquímicos das macrófitas são considerados como alternativa promissora e ambientalmente viável para o controle de florações de algas visto os seus potenciais algicidas (HONG et al., 2008a; NAKAI et al., 2000). Estes compostos podem alterar uma variedade de processos fisiológicos do fitoplâncton, como: divisão celular, sequestro de íons da água, respiração, fotossíntese, funções enzimáticas, bem como o sinal de transdução (ZHU et al., 2010).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para a investigação das atividades inibitórias das macrófitas aquáticas frente às cianobactérias e a degradação de cianotoxinas (GHOBRIAL; NASSR; KAMIL, 2015; LI et al., 2016; MENG et al., 2015; PAKDEL et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Para a eficiência da utilização dos aleloquímicos provenientes das macrófitas aquáticas, depende-se de dois fatores: quais organismos fitoplanctônicos estão expostos e a concentração do extrato utilizado (HILT; GROSS, 2008; NAKAI et al., 1999).

As espécies de macrófitas aquáticas submersas apresentam potencial para estudos, visto que elas produzem aleloquímicos como forma de inibição e controle de fitoplâncton, devido à competição por luz e nutrientes no ambiente (HILT; GROSS, 2008; HUANG et al., 2016; PAKDEL et al., 2013; QIMING et al., 2006; WANG et al., 2016). Por isso, para melhor entendimento e compreensão, o quadro 3 apresenta uma síntese de informações acerca dos efeitos das macrófitas submersas sobre as cianobactérias e os potenciais dos aleloquímicos sobre elas.

Conforme as informações expostas no quadro 3, é possível constatar que os testes realizados com macrófitas aquáticas submersas e o seu potencial alelopático em cianobactérias têm sido desenvolvidas há mais de 16 anos. Dentre as verificações, pode-se observar que destes estudos, a maioria utilizam *Microcystis aeruginosa* em seus testes e, dentre as espécies de macrófitas, *Myriophyllum spicatum* é uma das mais estudadas.



**Quadro 3. Estudos que demonstram a aplicação de extratos de macrófitas aquáticas submersas, bem como os aleloquímicos estudados para a verificação dos efeitos alelopáticos sobre as cianobactérias. EA= Extrato hidroalcoólico.**

<b>Macrófita</b>	<b>Extrato/Aleloquímico responsável pela atividade</b>	<b>Cianobactéria testada</b>	<b>Efeitos observados</b>	<b>Autores/ano</b>
<i>Cabomba caroliniana</i>	EA	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(NAKAI et al, 1996)
<i>Chara australis</i>	EA	<i>Anaebaena variabilis</i>	Inibição de crescimento	(PAKDEL et al., 2013)
<i>Ceratophyllum demersum</i>	EA e acetona 50%	<i>Microcystis aeruginosa/ Oscillatoria tenuis</i>	Inibição de crescimento	(GHOBRIAL; NASSAR E KAMIL, 2015)
	Óleo essencial/compostos voláteis	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(QIMING et al., 2006)
<i>Egeria densa</i>	EA	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(NAKAI et al, 1996)
<i>Myriophyllum spicatum</i>	EA	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(NAKAI et al, 1996)
	Polifenóis	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(GROSS et al., 1996) NAKAI et al., 2000)
	Ácido gálico/ ácido elágico	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento e redução da taxa fotossintética	(ZHU et al., 2010)
	Ácido pirogálico	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento, aumento de espécies reativas de oxigênio e iniciação da morte celular programada	(LU et al., 2017; NAKAI et al., 2000, ZHU et al., 2010)
	Catecinina	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento e redução da taxa fotossintética	(ZHU et al., 2010)
<i>Phragmites communis</i>	Etil-2-metil-acetoacetato	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Altera equilíbrio celular redox, gera estresse oxidativo, altera processos de divisão celular, fisiologia e processos bioquímicos	(HONG et al., 2008a; HONG et al., 2008b)
<i>Potamogeton crispus</i>	Extrato hidroalcoólico total	<i>Anaebaena variabilis</i>	Inibição de crescimento	(PAKDEL et al., 2013)
<i>Potamogeton pectinatus</i>	Extrato hidroalcoólico e acetona 50%	<i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Oscillatoria tenuis</i>	Inibição de crescimento	(GHOBRIAL; NASSAR E KAMIL, 2015)
<i>Vallisneria spiralis</i>	Óleo essencial	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibição de crescimento	(QIMING et al., 2006)

Referente às taxas de inibição de *M. aeruginosa* por espécies de macrófitas aquáticas submersas, foram verificadas alterações dos efeitos, quando utilizados diferentes solventes. Ghobrial; Nassr e Kamil, (2015) ao utilizarem os extratos líquidos, verificaram que, para *Ceratophyllum demersum* o extrato etanólico apresentou inibição máxima de 100%, enquanto que para o extrato utilizando acetona, não houve inibição, mas ocorreu um estímulo de crescimento de 72,13%. Já para a espécie *Potamogeton pectinatus*, o extrato etanólico e a acetona apresentou inibição máxima de 99,80%, entretanto, as variações ocorreram para as médias concentrações, demonstrando maior atividade do extrato etanólico, quando comparado ao extrato etanólico. Tais resultados demonstram que o solvente utilizado e a espécie de macrófitas selecionada podem variar, quanto à sua bioatividade.

Como otimização do processo, a aplicação de técnicas para isolamento, purificação e identificação dos aleloquímicos a partir de extratos de macrófitas têm sido desenvolvidas e demonstram-se eficazes (HONG et al., 2008a; HONG et al., 2008b; NAKAI et al., 2000; QIAN et al., 2009). Autores relacionam ácidos fenólicos, polifenóis e taninos hidrolisáveis, presentes em macrófitas que apresentaram o potencial alelopático, como os principais compostos relacionados com a inibição, (HILT; GROSS, 2008; HONG et al., 2008; HONG et al., 2008 b; NAKAI et al., 1999; NAKAI et al., 2000; ZHU et al., 2010).

Tais fatos demonstram a aplicabilidade e a importância de realizar estudos voltados à prospecção dos aleloquímicos das macrófitas submersas como forma de aplicação para o tratamento de locais contaminados com cianobactérias e cianotoxinas.

### 3.6.1 *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.

*Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. é uma macrófita aquática pertencente à família Haloragaceae. Originária da América do Sul, apresenta capacidade de colonizar diferentes tipos de ambientes aquáticos e tolerar distúrbios desses habitats (WERSAL et al., 2011). Sua distribuição é mundial, ocorrendo nos continentes

americanos, Ásia, África, Europa e Oceania (Fig. 3) (ARSHID et al., 2011; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2018).

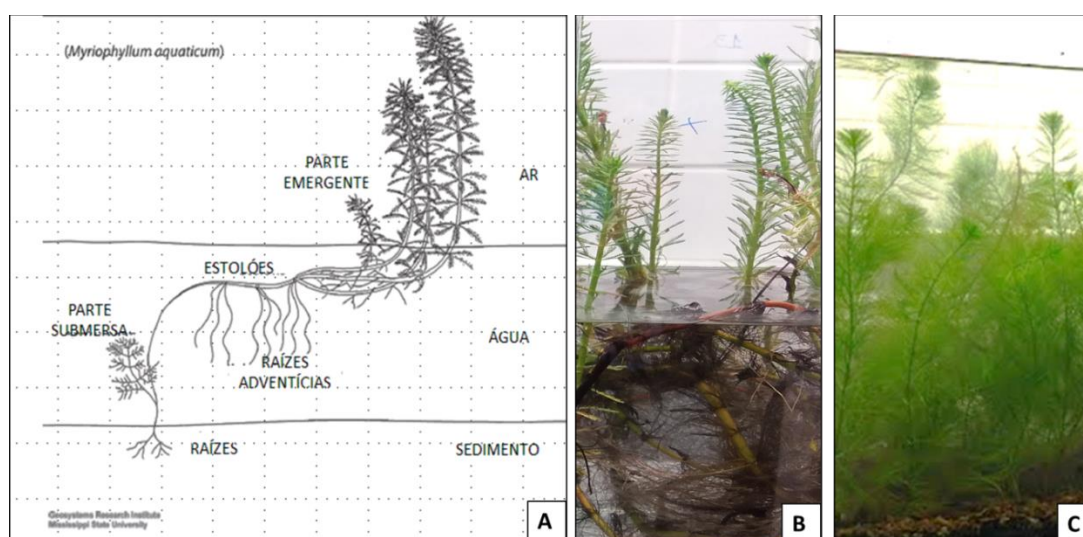
**Figura 3. Distribuição geográfica de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.**



**Fonte: Missouri Botanical Garden (2016)**

Macrófita aquática anfíbia pode ser classificada como: emergente em *wetlands* e submersa em corpos hídricos (ELBKE; FELTEN; DOREN, 2013). Como uma adaptação às diferenças nas condições ambientais, essa espécie é heterofílica, ou seja, apresenta duas morfologias e fisiologias, principalmente referente às modificações foliares (ELBKE; FELTEN; DOREN, 2013; WERSAL; MADSEN, 2010) (Fig. 4).

**Figura 4. Caracterização da heterofilia e hábito comportamental de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc no ambiente. A) Esquematisação da heterofilia; B) Comportamento emergente; C) Comportamento submerso.**



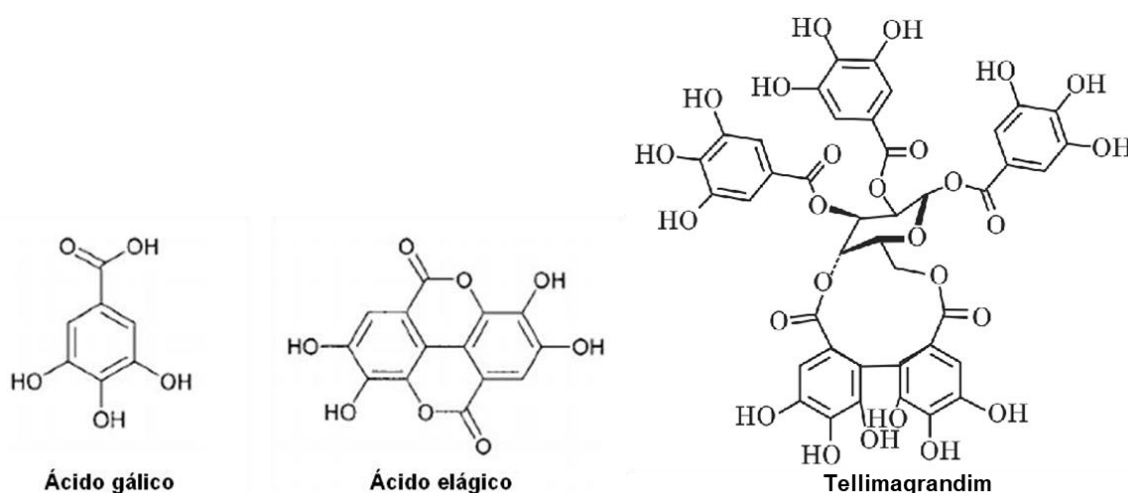
**Fonte: A: WERSAL; MADSEN (2011); B e C: autoria própria**

Como principais características de interesse de aplicações na restauração ecológica, *M. aquaticum* apresenta rápido desenvolvimento em ambientes eutrofizados, remoção e tratamento de poluentes e, seu potencial alelopático pode contribuir na regulação do ecossistema (CHENG et al., 2008; SOUZA et al., 2013).

O gênero *Myriophyllum* tem sido estudado devido à sua capacidade alelopática sobre cianobactérias. Como principais compostos responsáveis pela inibição de cianobactérias estão os compostos fenólicos (NAKAI et al., 1996; NAKAI et al., 2000; ZHU et al., 2010), principalmente o tellimagrandim II. Visto que a composição fitoquímica de *M. aquaticum*, bem como a relação com a bioatividade em cianobactérias apresentam poucos estudos, foi realizado um levantamento sobre as substâncias encontradas em espécies do gênero *Myriophyllum*, de modo a tentar elucidar alguns dos compostos que a espécie possivelmente pode apresentar, bem como a classe de compostos predominantes.

Dentre as substâncias que apresentaram maiores representatividades no gênero *Myriophyllum*, está a classe dos compostos fenólicos. Ao analisar o levantamentos dos dados, é possível verificar que tellimagrandin II (Fig. 5) está presente para as quatro espécies elencadas no quadro 4. Além disso, compostos como ácido gálico e elágico (Fig. 5), estiveram presentes em pelo menos duas espécies.

**Figura 5. Estruturas químicas de ácido gálico, ácido elágico e Tellimagrandim**



Fonte: Adaptado de Holtoon et al. (2003)

**Quadro 4. Elucidação da composição fitoquímica de espécies do gênero *Myriophyllum***

	Composição fitoquímica	<i>M. spicatum</i>	<i>M. aquaticum</i>	<i>M. verticillatum</i>	<i>M. sibiricum</i>
Alcalóides	2,4-Dimetil-hilpiridina	Presente			
	2,2,6,6,tetrametil-4-Piperidiona	Presente			
	111-pirro e 2,5-diona,3-etil-4-metil	Presente			
Cetonas	3-penten-2-ona, 4-metil	Presente			
	2-pentanona, 4hidroxi-4metil	Presente			
	2-pentanodecana,6,0,14-trimetil	Presente			
Terpenos	(7ar)-5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7-trimetil-2(4H)-benzafuranona	Presente			
	2,6,10,14-tetrametilpentadecano	Presente			
	(-)-loliolide	Presente			
	Neofitadieno	Presente			
	2,6,10,14-tetrametil-hexadecano	Presente			
	(2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	Presente			
	4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olóide	Presente			
Fenólicos	2-metóxi-4-vinilfenol	Presente			
	3-(1,1-dimetiletil)-4-metóxifenol	Presente			
	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol	Presente			
	2,20-metilenebis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol	Presente			
	Tellimagrandin II	Presente	Presente	Presente	Presente
	Ácido pirogálico	Presente			
	Ácido gálico	Presente	Presente	Presente	
	Ácido elágico	Presente			
	Catecinina	Presente			
	Eugenina		Presente		
	Epicatecinina-3-galato		Presente		
	1-desgaloileuginina		Presente		
	Catecinina-3-galato		Presente		

	HHDP-galo-glucose		Presente		
	Tri-galo-glucose		Presente		
	HHDP-tri-galo-glucose		Presente		
	Quercitina		Presente	Presente	
	Quercitrina		Presente		
	Avicularina		Presente		
Ácidos graxos	Ácido Tetradecanóico	Presente			
	Ácido Hexadecanóico	Presente			
	Ácido 9-Octadecenóico	Presente			
	metil (7S)- hidróxi-hexadeca-8E-, 13Z trienoato			Presente	
	Metil (10R)- hidróxi-hexadeca-7Z, 11E, 13Z-trienoato			Presente	
Álcoois graxos	1-Hexadecanol	Presente			
	1-Octadecanol	Presente			
	1-Icosanol	Presente			
Ésteres	Ácido éstermetil-pentadecanóico	Presente			
	Ácido estermetil-hexadecanóico	Presente			
	Ácido estermetil-heptadecanóico	Presente			
	ácido 9,12-estermetil-octadecadienóico	Presente			
	ácido 9,12,15-éstermetil-octadecatrienóico	Presente			
	ácido éstermetil-octadecanóico	Presente			
	Ácido 9,12-éster-octadecadienóico	Presente			
	ácido metil- éster-eicosanóico	Presente			
	ácido bis(2-etilhexil)-éster-hexanedióico	Presente			
	Éter-metil-ácido docosanóico	Presente			
	Éter-bis(2-etilhexil)-ácido decadienóico	Presente			
	Hexadecil-éster-ácido tetradecanóico	Presente			
	Hexadecanoil			Presente	
	Hexadec-11Z-enoil			Presente	

	Hexadeca-8Z-11Z-dienoil			Presente	
	Hexadeca-7Z,10Z,13Z-trienoil			Presente	
Hidrocarbonetos	Decano	Presente			
	2,5-dimetil-2-undeceno	Presente			
	Tetradeceno	Presente			
	1-Pentadeceno	Presente			
	Pentadecano	Presente			
	Hexadecano	Presente			
	Ciclohexadecano	Presente			
	1-Nanodéceno	Presente			
	Eneicoseno	Presente			
	2,6,10,15-tetrametil-octadecano	Presente			
	Ciclotetracoseno	Presente			
	Pentacosano	Presente			
	Heptacosano	Presente			
	Octacosano	Presente			
	Nanocosano	Presente			
Esteróis	(3b,5b)-colestan-3-ol,	Presente			
	(3b)-colest-5-en-3-ol,	Presente			
	Colestanol	Presente			
	(3b,24R)-Ergost-5-en-3-ol,	Presente			
	Estigmasta-5,22-dien-3-b-ol	Presente			
	c-Sitosterol	Presente			
Outros compostos	2-metil-n-(2-metilbutildieno)1-Butanamina,	Presente			
	4-Hidróxi-2,5-dimetil-3-furanona	Presente			
	5-Hidroximetil-2-furaldeído	Presente			

\*Quadro criado a partir dos trabalhos de: GRECA et al., (1989); GROSS (2003); GROSS et al., (2003); GROSS; SURFELD (1994); HAROON; ABDEL-AL (2016); LEU et al. (2002); MARKO et al. (2008); NAKAI et al. (2000); SAITO et al. (1989).

Estudos que realizaram a elucidação dos compostos que apresentavam bioatividade sobre cianobactérias, demonstraram que a classe dos compostos fenólicos apresentam maiores relações. Gross e Sutfeld (1994) atribuíram a atividade algicida para os polifenóis, principalmente para o ácido gálico e seus derivados. Gross (2003) e Gross et al. (1996) demonstram que o tellimagrandim II apresentou efeitos sobre o crescimento celular e potencial fotossintético e, Leu et al. (2002), além desses efeitos citados, verificaram que o composto é responsável pela morte celular devido à inibição de enzimas como a fosfatase alcalina. Tais compostos, assim como demonstrado no quadro 4, estão presentes em *M. aquaticum*, o que torna-se de grande relevância o estudo com a espécie.

Dentre os estudos referentes à atividade alelopática de *M. aquaticum* sobre as cianobactérias, está o uso de extratos e de co-cultura (experimentos *in vivo*). Cheng et al. (2008) estudou o meio de cultivo da macrófitas filtrado, para a inibição de *M. aeruginosa*, de modo a relacionar a bioatividade com os compostos liberados no meio; Wang et al. (2017) estudou um sistema de co-cultura da macrófitas com *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aqua* e, demonstrando atividades sobre a enzima superóxido dismutase, bem como interferências sobre o potencial fotossintético; Silveira (2012) estudou o efeito de extrato hidroetanólico sobre *M. aeruginosa* e registrou inibições de 99%. Saito et al. (1989), ao realizar o fracionamento de extratos hidroetanólicos, verificou que sete substâncias da classe dos compostos fenólicos apresentaram efeitos sobre *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* sendo as substâncias bioativas: eugenina, 1-desgalol-leugenina, epicatecinina-3-galato, catecinina-3-galato, ácido gálico, quercetina, quercitrina e avicularina.

Considerando que ainda são poucos os estudos relacionados aos efeitos alelopáticos da espécie *M. aquaticum* e considerando os resultados de trabalhos anteriores (SILVEIRA, 2012), constata-se a necessidade de ampliar as abordagens das pesquisas que busquem compreender os possíveis mecanismos alelopáticos envolvidos no processo de inibição que a macrófita exerce sobre as cianobactérias e sobre a produção de cianotoxinas, vislumbrando a potencialidade de futuras aplicações em ambientes com necessidade de prevenção de florações ou mesmo em situações de remediação.



## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

O estudo foi realizado com células cultivadas da cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa*, que foi fornecida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos em março de 2011. Desde então, a cepa é mantida e cultivada no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) sob condições controladas.

O cultivo foi realizado em meio sintético de cultivo ASM-1, com descrição de sua composição na Tabela 1.

**Tabela 1. Composição do meio de cultivo líquido ASM-1**

Solução-estoque	Nutrientes	Quantidades (g L <sup>-1</sup> )	Volume (mL) para preparo de 1000 mL de meio
<b>Solução A</b>	NaNO <sub>3</sub>	8,500	20
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,450	
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,050	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,450	
<b>Solução B</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,700	2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	17,800	
<b>Solução C</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,400	0,1
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	13,900	
	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,800	
	ZnCl <sub>2</sub>	3,350	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,190	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,014	
<b>Solução D</b>	EDTA tetríplex	18,600	0,4

Fonte: JACINAVICIUS et al., 2013, adaptado de GORHAM et al., 1964)<sup>2</sup>.

*M. aeruginosa* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250, 500 e 1000 mL, nas condições de: temperatura de 22-28 °C; intensidade luminosa de 2150±230 lux; fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e concentração inicial de 1,6 x10<sup>5</sup> celmL<sup>-1</sup> (ALMEIDA et al., 2016). Os frascos foram mantidos fechados com agitação manual uma vez por dia.

Para a manutenção da cepa, foram realizados repiques a cada 20 dias, durante a fase exponencial de crescimento, de modo que a concentração celular inicial fosse de  $1,6 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. A morfologia das células, presença de possíveis contaminações foram verificadas por análises mensais em microscópio óptico sob aumento de 400 vezes (Primo Star®, Zeiss).

## 5.2 Parâmetros de monitoramento para *M. aeruginosa*

### 5.2.1 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados na presente pesquisa foram descritos no quadro 5. Nele, está contido o equipamento, marca, bem como os procedimentos aplicados.

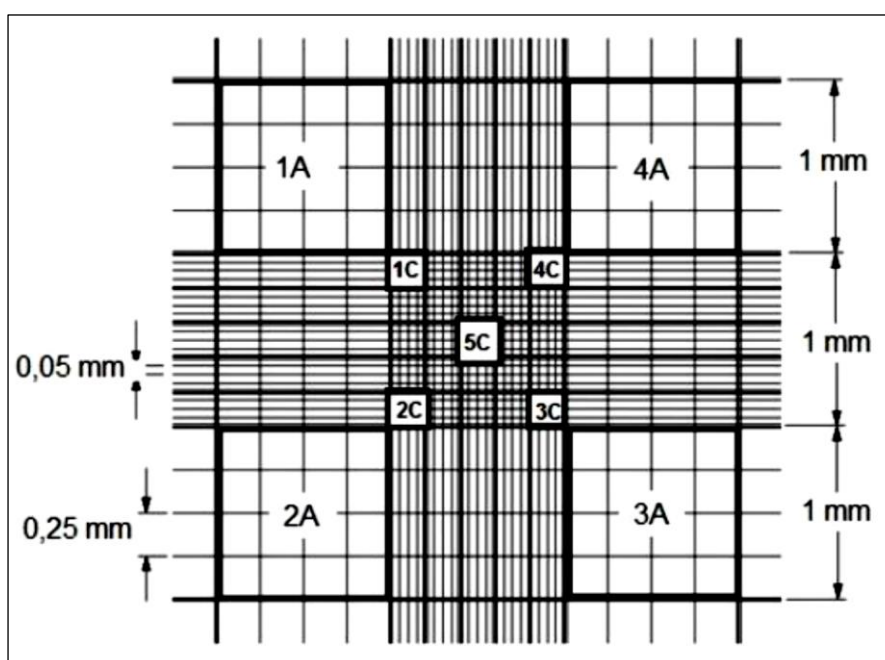
**Quadro 5. Equipamentos utilizados para o desenvolvimento das metodologias empregadas na presente pesquisa**

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Procedimento utilizado</b>
Espectrofotômetro UV-VIS	UV-1800®, SHIMADZU	Análise de clorofila-a e pigmentos acessórios; análise dos compostos fenólicos totais e; fosfato total
Ultracentríífuga	CF15RN®, HITACHI	Análise de clorofila-a e pigmentos acessórios; análise de microcistina-LR
Banho de ultrassom	Ultrasonic Clear, CRISTÓFOLI	Produção de extratos vegetais
Rotaevaporador	Fisatom 801, FISATOM	
Ultrafreezer	INDREL	
Liofilizador	L101®, LIOTOP	
HPLC-DAD	Prominence, Shimadzu®	Análise de microcistina-LR

### 5.2.2 Determinação de concentração celular

A verificação da concentração celular foi feita através de contagem utilizando câmara de Neubauer e visualização em microscópio de luz sob aumento de 400 vezes (Fig. 6).

**Figura 6. Esquema representativo da Câmara de Neubauer (profundidade de 0,100 mm). A) Quadrante grande; C) quadrante médio**



Fonte: Silveira, 2012.

Para determinar o valor de concentração celular, posteriormente à contagem na Câmara de Neubauer, foram utilizadas as equações 1 ou 2. Para as contagens celulares realizadas nos quadrantes grandes, foi utilizada a equação 1, enquanto que para quadrantes médios, foi utilizado a equação 2.

$$y = X_A \cdot FD \cdot 10^4 \quad (1)$$

$$y = X_C \cdot FD \cdot 1,6 \cdot 10^5 \quad (2)$$

Sendo:

$y$  = concentração celular (células mL<sup>-1</sup>)

$X_A$  = média das contagens entre os quatro campos indicados pela letra A;

XC= média das contagens entre os cinco campos indicados pela letra C;  
FD= fator utilizado para diluições que forem realizadas (quando não realizada diluição, o valor é 1).

Com o intuito de verificar a cinética de crescimento celular, foi realizada a contagem celular de frascos de cultivo (n=3) a cada 48 horas a partir da data da inoculação. Todos os frascos apresentaram concentração celular inicial de  $1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. Esse experimento foi importante para verificar a taxa de crescimento da cepa de *M. aeruginosa*, bem como a quantidade de dias necessários para o início dos experimentos, os quais precisariam se iniciar em concentração celular de  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>.

### 5.2.3 Determinação de clorofila-a

Para análise deste pigmento fotossintetizante, foram retiradas alíquotas dos frascos experimentais (6 mL, n=3), para a centrifugação a 10500 rpm durante quatro minutos, a 20 °C em ultracentrífuga. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foram adicionados 2 mL de acetona 80% (v/v), utilizada como o solvente de extração.

Após a homogeneização manual e ressuspensão do *pellet* no solvente, a amostra foi mantida sob refrigeração e ausência de luz por 24 horas para a extração dos pigmentos. Posteriormente, a amostra foi novamente homogeneizada e centrifugada sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda 646 e 663 nm. Como branco da leitura da amostra, foi utilizada acetona 80% (v/v). Para o cálculo de concentração de clorofila-a, foi utilizada a equação 3 (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983).

$$\text{Clorofila-a (mg L}^{-1}\text{)} = 12,21 \cdot (A_{633}) - 2,81 \cdot (A_{646}) \quad (3)$$

Em que:

$A_{633}$ = Valor de absorbância em 633 nm

$A_{646}$ = Valor de absorvância em 646 nm.

#### 5.2.4 Determinação de pigmentos acessórios

Os pigmentos foram analisados a partir de alíquotas dos frascos experimentais (10 mL, n=3) que foram transferidos para tubos falcon (capacidade de 15 mL) e, posteriormente, realizados dois ciclos de congelamento/descongelamento para a liberação dos pigmentos no sobrenadante (RIZZO, 2015). Houve modificações na metodologia para reduzir o tempo do processo, sendo que a centrifugação foi realizada a 10500 rpm em ultracentrífuga durante quatro minutos, enquanto na metodologia descrita o procedimento era de centrifugação a 8000 rpm durante 20 minutos.

O sobrenadante foi levado ao espectrofotômetro para a leitura das absorvâncias de cada pigmento acessório, sendo os comprimentos de onda de 565 (ficoeritrina {PE}); 620 (Ficocianina {PC}) e 650 nm (aloficocianina {APC}). Além das absorvâncias de ficobiliproteínas, foi utilizado o comprimento de 750 nm para a avaliação da presença de resíduos de fragmentos celulares. Como branco das análises, foi utilizado o próprio meio ASM-1. As concentrações de ficobiliproteínas foram estimadas por meio das equações cromáticas de Bryant (CHAPMAN; KREMER, 1988). Os valores obtidos nos comprimentos descritos foram subtraídos da medida de 750 nm para eliminar a interferência dos resíduos celulares na leitura dos pigmentos acessórios. As concentrações de ficobiliproteínas foram apresentados em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

$$\text{PC (mg mL}^{-1}\text{): } \{A_{620} - (0,72 \times A_{650})\} / 6,20 \quad (4)$$

$$\text{APC (mg mL}^{-1}\text{): } \{A_{650} - (0,191 \times A_{620})\} / 5,79 \quad (5)$$

$$\text{PE (mg mL}^{-1}\text{): } (A_{565} - \{2,41 \times \text{PC}\} - (1,41 \times \text{APC})) / 13,02 \quad (6)$$

$$\text{Ficobiliproteínas totais (mg mL}^{-1}\text{): } \text{PC} + \text{APC} + \text{PE} \quad (7)$$

Em que:

$A_{620}$ = absorvância obtida no comprimento de onda 620nm;

$A_{650}$ = absorvância obtida no comprimento de onda 650nm;

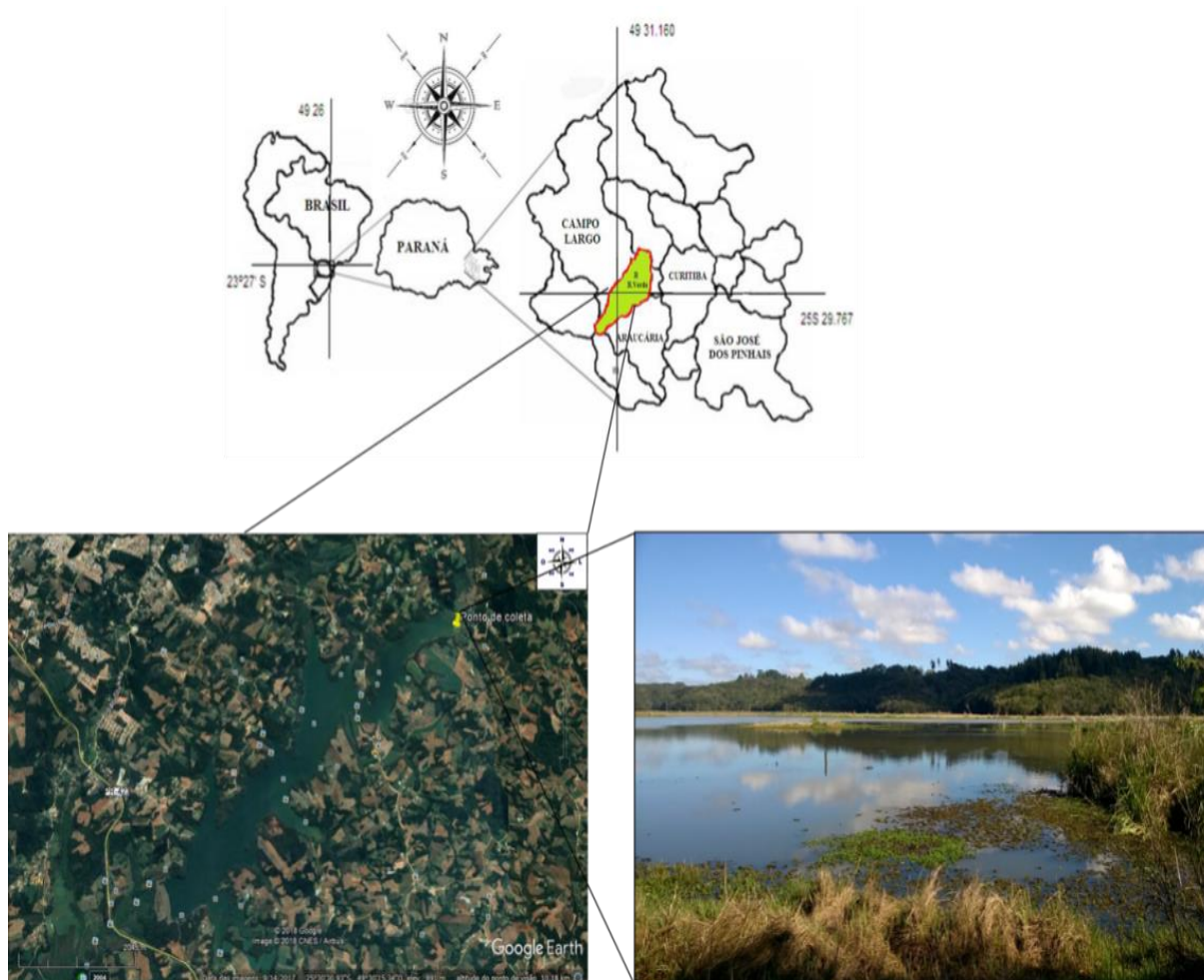
$A_{665}$ = absorvância obtida no comprimento de onda 665 nm.

### 5.3 Ensaios de inibição com extratos de *Myriophyllum aquaticum* sobre *Microcystis aeruginosa*: comparação entre diferentes soluções extratoras

#### 5.3.1 Coleta de amostras vegetais de *M. aquaticum*

Amostras vegetais de *M. aquaticum* foram coletadas em profundidades de até 1 metro (margem) no reservatório do Rio Verde, localizado na região do município de Araucária, Paraná, nas coordenadas 25°29'15,72" S 49° 28'14,25" O (Fig. 7).

Figura 7. Ponto de coleta de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc , município de Araucária, PR.



Fonte: Adaptado de Medeiros; Ludka; Caneparo (2010); Google Earth (2018)

As plantas coletadas foram transportadas para o laboratório e lavadas em água corrente para a remoção de sujidades. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa a 33 °C por 15 dias, até completa desidratação, quando o material apresentou peso constante (SIMÕES, 2010). Após a secagem, o material foi triturado em liquidificador e peneirado para a padronização granulométrica (malha de 0,5 mm), obtendo-se o material pulverizado.

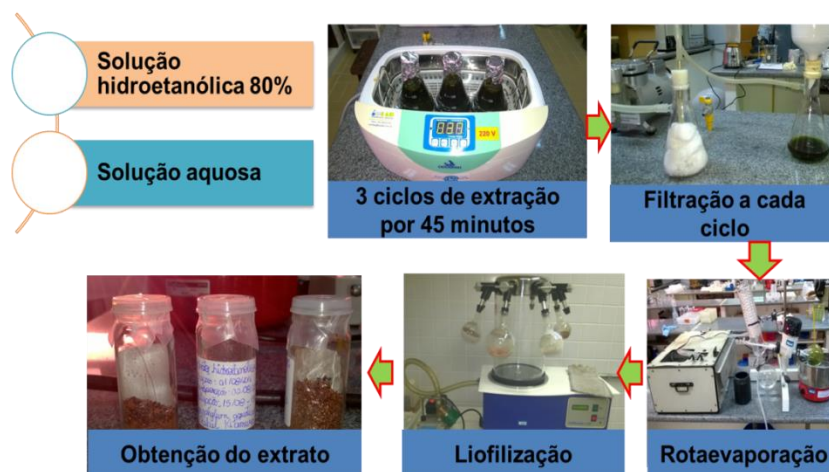
### 5.3.2 Obtenção dos extratos de *M. aquaticum*

Para a obtenção dos extratos, o material vegetal pulverizado foi pesado, adicionado do líquido extrator na proporção de 20 % (20 g para 100 mL de solvente); o processo utilizado para extração foi a aplicação de ultrassom, dispendo o recipiente no banho ultrassônico e mantendo por três ciclos de 45 minutos. A cada ciclo, o solvente extrator era filtrado e o resíduo vegetal retornado ao recipiente e seu solvente renovado. Assim, ao término de três ciclos, obteve-se aproximadamente 300 mL de extrato líquido. Posteriormente ao processo de extração, os extratos foram filtrados e, os materiais contendo etanol foram rotaevaporados para a remoção do solvente (Fig. 8).

Os líquidos extratores utilizados foram de dois tipos: água purificada em sistema de osmose reversa e solução hidroetanólica 80% (v/v), que forneceram respectivamente o extrato aquoso e o extrato hidroetanólico de *M. aquaticum*.

Após a obtenção dos extratos, foi feito pelo congelamento a -80 °C em ultrafreezer e liofilização. Os extratos liofilizados foram armazenados a -20 °C, até o preparo das amostras para os testes de inibição (Fig. 8).

Figura 8. Esquema representativo dos procedimentos metodológicos do processo de extração dos compostos de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.



Fonte: autoria própria

### 5.3.3 Ensaios de inibição de *M. aeruginosa* a extratos de *M. aquaticum*

Para o preparo dos ensaios de inibição, foi feita a solubilização dos extratos em meio ASM-1 e a partir de uma solução-estoque ( $1000$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), foram preparados os experimentos com as seguintes concentrações de extrato:  $0,01$ ;  $0,1$ ;  $1$ ;  $10$ ;  $50$ ;  $100$  e  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . A solução-estoque foi preparada a partir da diluição dos extratos liofilizados, em balões volumétricos de  $1 \text{ L}$  nas concentrações de  $10$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

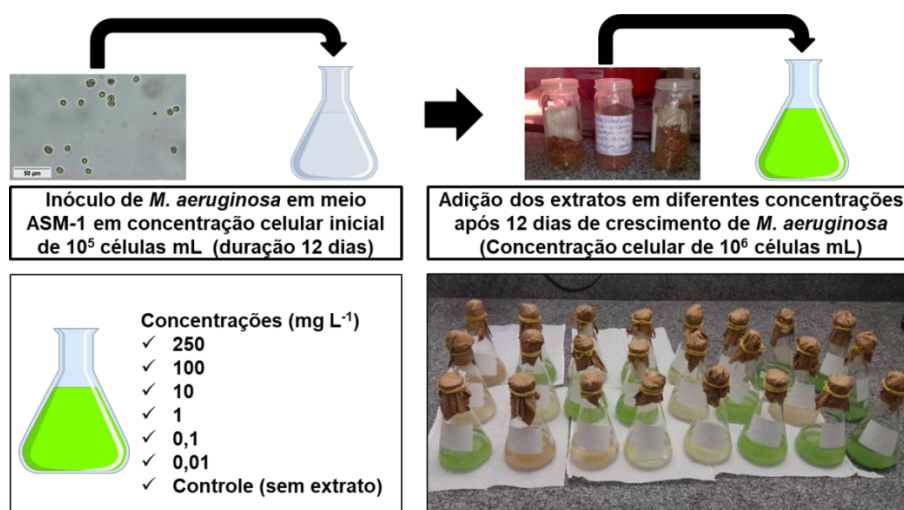
Para a realização dos testes foram utilizados cultivos celulares em fase exponencial de crescimento, com concentração inicial de  $10^6 \text{ cél mL}^{-1}$  (aproximadamente 12 dias de cultivo, a partir da concentração inicial de  $10^5 \text{ cél mL}^{-1}$ ).

Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de  $125 \text{ mL}$ . Foi estabelecido o cultivo de *M. aeruginosa* por um período de 12 dias, atingindo concentração celular de  $10^6 \text{ células mL}^{-1}$  em frascos Erlenmeyer de  $2 \text{ L}$ . Após, foram retiradas alíquotas dos cultivos de *M. aeruginosa* e dos extratos nas concentrações-testes estabelecidas, proporcionalmente, de modo que o volume final fosse de  $100 \text{ mL}$  por frasco. As proporções de cultivo + extrato foram:  $0,01$  ( $0,1 \text{ mL}$  de solução-estoque  $10 \text{ mg L}^{-1}$  +  $99,9 \text{ mL}$  de cultivo);  $0,1$  ( $1 \text{ mL}$  de solução-estoque  $10 \text{ mg L}^{-1}$  +  $99 \text{ mL}$  de cultivo);  $1$ ; ( $10 \text{ mL}$  de solução-estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  +  $90 \text{ mL}$  de cultivo);  $10$  ( $1 \text{ mL}$  de solução-estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  +  $99 \text{ mL}$  de cultivo);  $50$  ( $5 \text{ mL}$  de solução-



estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  + 95 mL de cultivo); 100 (10 mL de solução-estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  + 90 mL de cultivo); 250  $\text{mg L}^{-1}$  (25 mL de solução-estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  + 75 mL de cultivo) e controle (sem adição do extrato) (Fig. 9). Todos os recipientes-testes foram mantidos sob as mesmas condições do cultivo inicial (item 5.1) e distribuídos aleatoriamente sobre a bancada, para reduzir possíveis tendências.

**Figura 9. Esquema representativo dos procedimentos metodológicos dos testes de inibição utilizando extratos de *Myriophyllum aquaticum* sobre *Microcystis aeruginosa***



Fonte: autoria própria

Para o acompanhamento do efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento celular foi feita a retirada de alíquotas de cada frasco teste ( $20 \mu\text{L}$ ), do dia inicial e, posteriormente, a cada 48 horas durante 09 dias, para verificar o crescimento celular por meio da contagem (item 5.2.1). A taxa de inibição foi calculada conforme a equação 8, proposta por Cheng et al. (2008).

$$TI = [1 - (N_0 / N^1) 100] \quad (8)$$

Em que:

TI= Taxa de inibição (%)

N= Concentração celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) com exposição aos extratos

$N_0$ = Concentração celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) sem exposição aos extratos (Controle).

Os efeitos sobre o potencial fotossintético de *M. aeruginosa* foi analisado por meio do teor de clorofila (item 5.2.2) e de pigmentos acessórios (ficobiliproteínas) (item 5.2.3) retirados no último dia de experimento (9º dia).

#### 5.3.4 Teste de viabilidade celular

Para a verificação da viabilidade celular de *M. aeruginosa*, foram feitas reinoculações dos cultivos, transferindo 1 mL dos frascos experimentais no último dia de exposição para tubos de ensaio contendo 9 mL de meio ASM-1 (em triplicata). Foi realizada a determinação da concentração de células após 10 dias de cultivo sob mesmas condições de cultivo, luminosidade e temperatura anteriormente descritas (item 5.1), de modo a verificar se os extratos apresentaram potencial algicida ou algistático.

#### 5.3.5 Análise de Microcistina-LR

A concentração de microcistina-LR das amostras de cultivo e dos frascos de experimentos de inibição foi avaliada por método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos previamente validado no laboratório. Para esses experimentos, foi realizado pré-tratamento de alíquotas dos recipientes experimentais por meio de extração em fase sólida (SPE), após três ciclos de congelamento e descongelamento das amostras (50 mL) para o rompimento celular e liberação das microcistinas no meio extracelular. Alíquotas (40 mL) foram centrifugadas em tubo *Falcon*, a 8000 rpm, por 20 minutos a 10 °C para remoção de debris celulares.

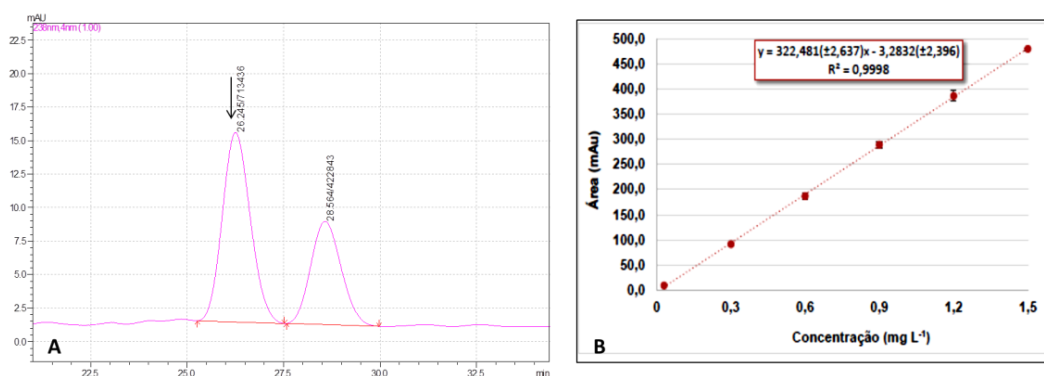
Para SPE (extração em fase sólida), foram utilizados cartuchos C18 (1000mg, Applied Separations), que foram acoplados ao sistema do tipo *manifold* (Agilent) e bomba a vácuo (Logen Scientific) para o controle de pressão no sistema (-3,5 inHg). Os cartuchos foram condicionados com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura. Após, 10mL da amostra foi aplicada no cartucho, seguido de secagem do

cartucho por um minuto. O *cleanup* foi feito pela aplicação de 10 mL de água ultrapura e a eluição com 10 mL de metanol 100%. O solvente do eluato foi evaporado completamente sob fluxo de ar comprimido, e a amostra foi redissolvida em 1 mL de água ultrapura e homogeneizada em agitador do tipo vórtex (Vixar). As amostras foram transferidas para recipientes do tipo *vials* e injetados 50  $\mu$ L para análise cromatográfica.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu®), composto por uma bomba quaternária LC-2AT, degaseificador DGU-20A, forno CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e controladora CBM-20A, sendo o sistema operado pelo programa LCSolutions. A separação foi obtida em coluna de fase estacionária octadecilsílica híbrida XTerra®(Waters) de 150 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno com partículas de 3,4  $\mu$ m.

O método cromatográfico utilizado foi previamente desenvolvido e validado por Torres (2016). A fase móvel consiste em: solvente A (ácido trifluoracético 0,05%) e solvente B (metanol grau HPLC, J.T Baker). A vazão foi de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$  e a temperatura mantida a 35 °C. A separação foi realizada em condições isocráticas com 50% do solvente B por 50 minutos, seguida de gradiente de limpeza (50 a 100% de solvente B em 2 minutos, mantido em 100% por 10 minutos), com o retorno para a condição inicial por 2 minutos. O monitoramento da separação das fases foi feita no intervalo de 190 a 450 nm e os cromatogramas foram monitorados a 238 nm (fig. 10A). Para a quantificação de microcistina-LR foi utilizada a curva de calibração de Torres (2016) (Fig. 10B).

**Figura 10. Quantificação de microcistina-LR: A) Cromatograma obtido a 280 nm. B) Curva de calibração analítica para a quantificação de microcistina-LR, obtida por regressão linear. ↓ indica o pico observado da microcistina-LR**



Fonte: A) O autor; B) TORRES (2016).

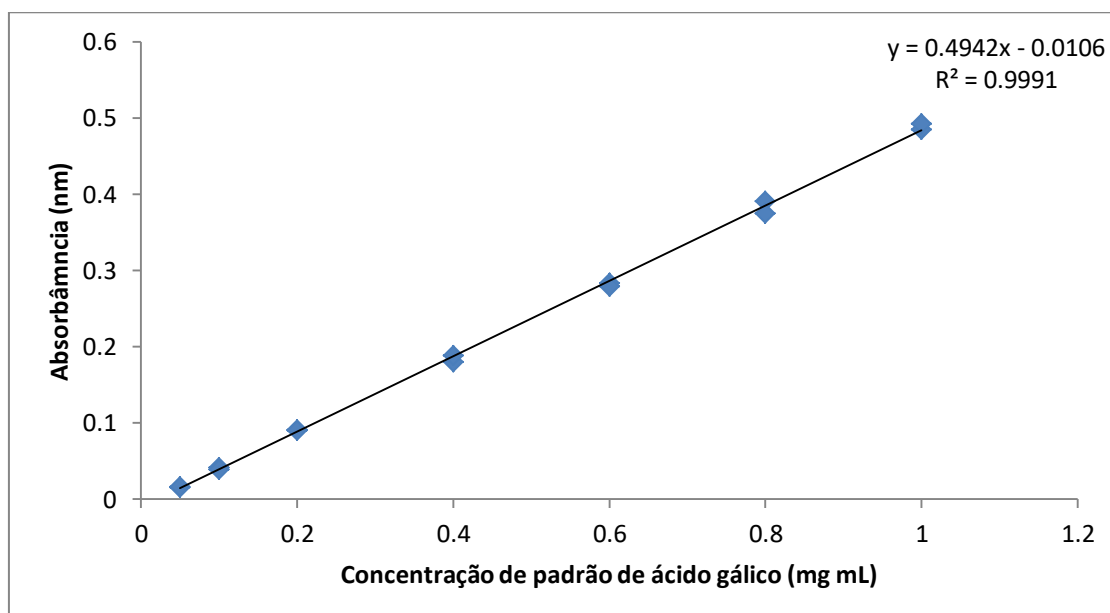
### 5.3.6 Análise de Compostos fenólicos dos extratos vegetais

A determinação foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (AMERINE; OUGH, 1976). Para a análise, foram preparadas soluções-estoque de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  dos extratos liofilizados de *M. aquaticum*.

Em um balão volumétrico de 10 mL, foram adicionados 5 mL de água de osmose, 150  $\mu\text{L}$  dos extratos de *M. aquaticum* e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (SigmaAldrich®), sendo necessário o repouso do material por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 15% e água de osmose até completar o volume de 10 mL. Após o preparo, todos os balões foram armazenados em local escuro (para evitar oxidação dos reagentes) por duas horas.

A análise foi realizada pela leitura em espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800®, SHIMADZU) no comprimento de 765 nm em cubetas de 10 mm. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizada a curva de calibração a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 ; 0,8 e  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 11), conforme regressão linear obtida de  $R^2 = 0,999$

**Figura 11. Curva de calibração analítica para a quantificação de compostos fenólicos totais, obtida por regressão linear (n = 3 para cada concentração).**



Fonte: autoria própria

#### **5.4 Comparação sazonal dos efeitos do extrato hidroetanólico de *M. aquaticum* sobre *M. aeruginosa***

Os experimentos foram realizados com o intuito de avaliar se ocorreria diferenças no processo de inibição conforme as mudanças sazonais. Para tanto, foram realizadas coletas de *M. aquaticum* nas estações de outono/2016, inverno/2016, primavera/2016 e verão/2017. Os procedimentos de coleta, preparo, secagem e extração dos compostos da planta estão descritos no item 5.3.1. Para a produção dos extratos, foi realizada a extração apenas com a solução hidroetanólica.

Para o preparo dos ensaios de inibição, foram montados os experimentos nas concentrações-testes: 0,1; 10; 100 mg L<sup>-1</sup> e controle (sem adição do extrato). As inibições foram realizadas conforme a descrição do item 5.3.2.

Os parâmetros analisados foram os efeitos sobre o crescimento e viabilidade celular de *M. aeruginosa*, efeitos sobre clorofila e pigmentos acessórios, efeitos sobre a concentração de microcistina-LR e análise do teor de compostos fenólicos dos extratos de cada estação.

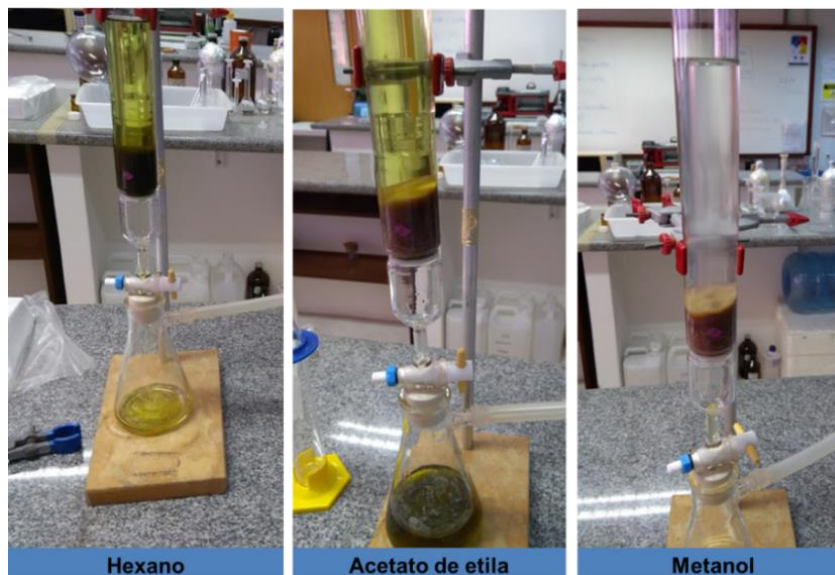
#### **5.5 Fracionamento do extrato hidroetanólico de *M. aquaticum***

O fracionamento dos extratos foi realizado por separação cromatográfica a vácuo em coluna de vidro, utilizando sílica gel (Sys Croma – 230-400 mesh) como fase estacionária (Fig. 12). O fracionamento foi realizado com o extrato hidroetanólico 80% dos períodos de outono/2016 e outono/2017, de modo a verificar se ocorreria variações entre os efeitos das frações em uma variação interanual.

A fase estacionária foi pesada (10 g) em um almofariz e nele foi adicionado 1,5 g de extrato hidroetanólico liofilizado de *M. aquaticum*. Foi adicionado acetato de etila gradualmente e misturado com pistilo, até ocorrer a homogeneização do conteúdo. O acetato de etila foi evaporado, visto que sua função era auxiliar na incorporação do extrato à sílica. O empacotamento da coluna foi feito com solvente orgânico (hexano P.A.) e, para a eluição das frações, a extremidade inferior da

coluna foi adaptada a um frasco kitassato e este a uma bomba de vácuo; foram utilizados três solventes: hexano (100 mL), acetato de etila (250 mL) e metanol (100 mL) (COLLINS, 2006).

Figura 12. Fracionamentos do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum*.



Fonte: autoria própria

As frações foram colocadas em balões de fundo redondo (capacidade 250 mL), rotaevaporadas para remoção dos solventes, congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer e liofilizadas. As frações liofilizadas foram pesadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em frascos de vidro limpos, secos e bem tampados.

Para o preparo dos testes de inibição, foi feita a solubilização dos extratos em meio ASM-1 e a partir de uma solução-estoque de  $1000\text{ mg L}^{-1}$ , foram preparados os experimentos nas concentrações-testes:  $0,1$ ;  $10$ ;  $100\text{ mg L}^{-1}$ , controle (sem adição do extrato) e controle com dimetilsulfóxido, pois houve a necessidade de utilização do solvente para a solubilização dos extratos. Os experimentos foram realizados conforme a descrição do item 5.3.2.

Os parâmetros analisados foram: efeitos sobre o crescimento e viabilidade celular de *M. aeruginosa*, efeitos sobre clorofila-a e pigmentos acessórios, concentração de microcistina-LR, e análise do teor de compostos fenólicos dos extratos de cada fração.

## 5.6 Ensaio de inibição de *M. aeruginosa* em experimentos de co-cultura com *M. aquaticum* (experimentos “*in vivo*”)

Amostras de *M. aquaticum* foram obtidas no reservatório do Rio Verde, localizado na região do município de Araucária, Paraná. Além disso, foram cultivadas plantas adquiridas comercialmente para averiguar o potencial alelopático da espécie provenientes de origens diferentes.

As plantas advindas do reservatório permaneceram em uma caixa d'água de capacidade de 15000 litros por aproximadamente dois meses e, uma semana antes de se iniciar os experimentos, as plantas foram aclimatadas em laboratório nas condições de: temperatura média de 25 °C; intensidade luminosa de 2150±230 lux; fotoperíodo de 12/12h claro/escuro. Já para as plantas cultivadas no laboratório, a aclimação foi realizada por dois meses sob condições de: temperatura média de 25 °C; intensidade luminosa de 2728 lux±191 lux; fotoperíodo de 12/12h claro/escuro

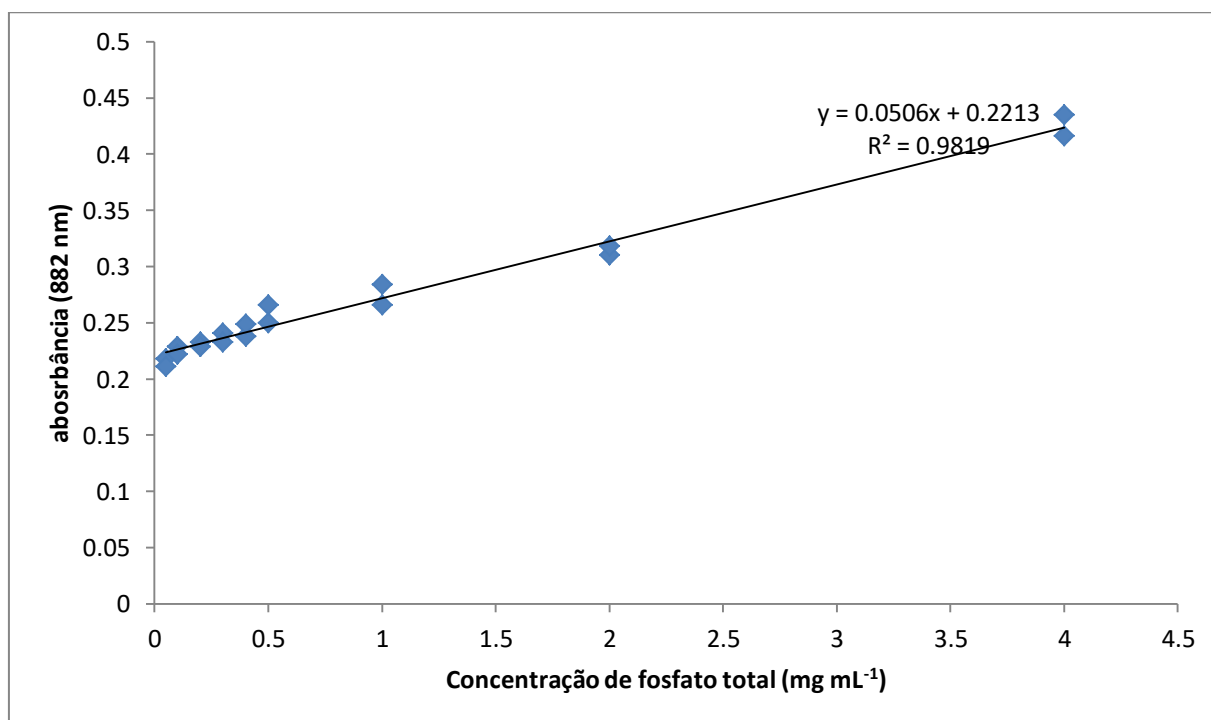
Para os testes de inibição, foram delimitados três tipos de tratamentos: utilização de estacas de *M. aquaticum* com o inóculo de *M. aeruginosa* (TCP+Ma), sem planta com o inóculo de *M. aeruginosa* (TControle) e uso de planta artificiais, para verificar possíveis efeitos de competição por espaço (TCPA+Ma). Para os testes utilizando *M. aquaticum*, foram usadas estacas de plantas que apresentavam 40 (±2)cm de comprimento da parte submersa.

Os experimentos foram realizados em béqueres (capacidade de 1 Litro) contendo 1 litro de meio ASM-1. Foram colocadas duas plantas (aproximadamente 10 (±1) gramas de biomassa) em cada recipiente e posteriormente foi feito o inóculo de *M. aeruginosa*, (concentração celular inicial  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O acompanhamento da inibição de *M. aquaticum* sobre o crescimento celular foi feita a partir da retirada de amostras diárias em um período de sete dias, de cada frasco teste, para verificar o crescimento celular por meio da contagem em Câmara de Neubauer. Para verificar os efeitos sobre o potencial fotossintético de *M. aeruginosa* foi analisado pela análise do teor de clorofila (item 5.2.2) e teor de pigmentos acessórios (ficobiliproteínas) (item 5.2.3). Ainda, foram feitas análises de microcistina-LR (item 5.3.5), bem como a análise do teor de compostos fenólicos dos tratamentos (item 5.3.6)

A fim de investigar a influência da competição por nutrientes limitantes para o crescimento de *M. aeruginosa*, foi realizada a análise de ortofosfato total por meio da digestão utilizando persulfato de potássio. Para tanto, foram utilizados 5 mL de amostra de cada frasco-teste e acrescentados 666  $\mu\text{L}$  de reagente de oxidação. Posteriormente, a amostra foi tampada com rolha e papel alumínio e autoclavada a 1atm, 120 °C, durante 30 minutos. Após o resfriamento da amostra, foram adicionados 566  $\mu\text{L}$  de reagente misto (Solução estoque: 25 mL Tartarato de antimônio e potássio + 50 mL de molibdato de amônio +125 mL de Ácido sulfúrico (140:900 v/v) + 50 mL ácido ascórbico) e após 30 minutos de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 882 nm (VALDERRAMA, 1981). Para a quantificação, foi utilizada a curva de calibração a partir de soluções de fosfato monobásico de potássio, nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 ; 0,25 ; 0,5; 1; 2; 4; 8  $\text{mg mL}^{-1}$  (Fig. 14) conforme regressão linear de  $R^2= 0,9819$ .

**Figura 13. . Curva de calibração para a análise de fosfato total.**



Fonte: autoria própria



## 5.7 Análises dos dados

Após a coleta dos dados, os valores foram tabulados e, posteriormente, calculadas as médias e respectivos desvios-padrão (Excel® versão 2013, Microsoft). Para as análises estatísticas foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Visto que todos os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para todas as análises realizadas, sendo consideradas as diferenças significativas em que  $p \leq 0,05$  (Past® versão 2.17c).

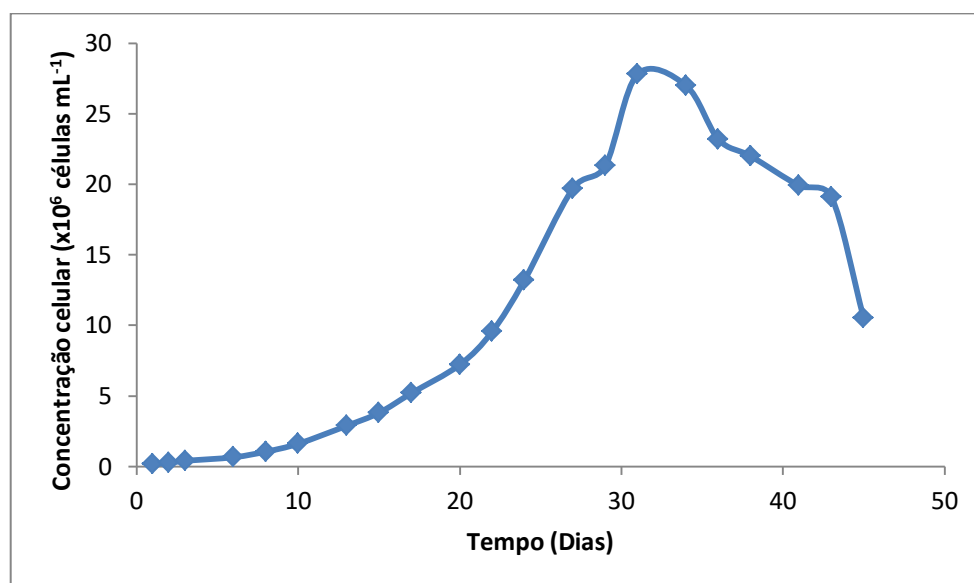
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Cinética de crescimento de *M. aeruginosa*

A análise de crescimento celular foi realizada para o acompanhamento do desenvolvimento do cultivo da cepa, bem como avaliar o tempo necessário para que se fosse possível a realização dos experimentos de inibição (Fig. 14).

Considerando que os cultivos tiveram concentração celular inicial de  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Verificou-se que a fase lag consistiu do 1º a 8º dia de experimento. Entre o 8º a 12º dia de crescimento, a média obtida de concentração celular esteve acima de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , sendo o período em que se iniciou a fase lag (exponencial) de crescimento de *M. aeruginosa*. Tal condição permitiu a averiguação do período (em dias) para que fosse inoculado o cultivo e, conseqüentemente, permitiria o início dos experimentos. Silveira (2012), também observou início da fase log (exponencial) entre o 7º a 15º dia de crescimento para o mesmo cultivo de *M. aeruginosa*.

Figura 14. Crescimento celular de cultivo de *Microcystis aeruginosa* ao longe de 48 dias



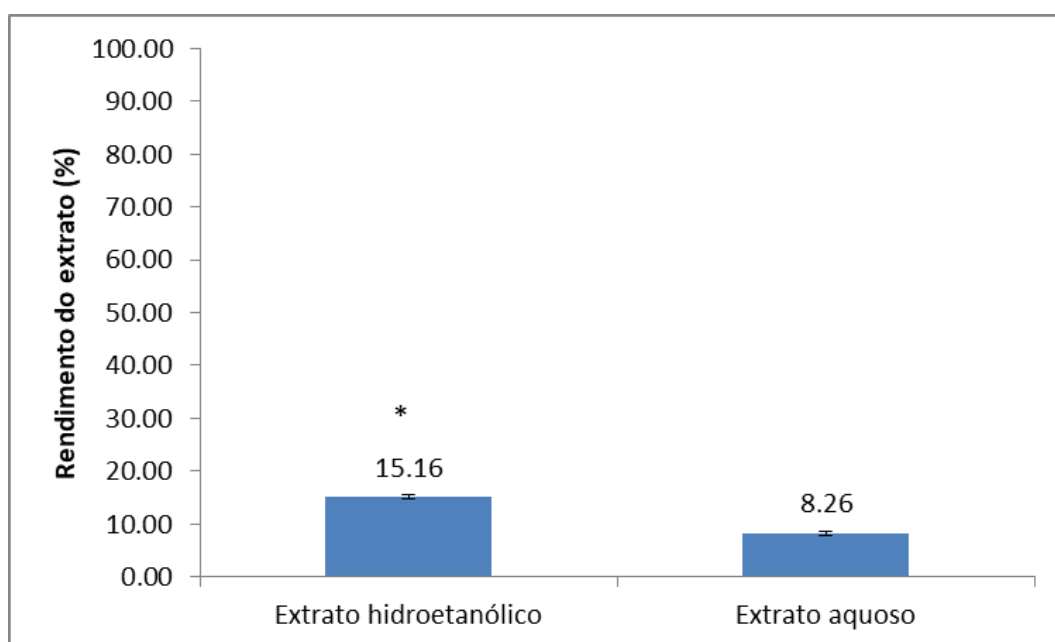
Fonte: autoria própria

Constatou-se que, no 20º dia o cultivo estava no período intermediário da fase log, apresentando uma concentração celular média de  $7,21(\pm 0,64) \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Nota-se que no 34º dia houve a concentração celular máxima de  $2,78 (\pm 0,04) \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , sendo possível observar o início da fase de declínio e o processo de morte celular após o período de 36 dias.

## 6.2 Rendimentos dos extratos de *M. aquaticum*

Constatou-se que o extrato hidroetanólico apresentou maior rendimento, quando comparado ao extrato aquoso ( $p=0,00002$ ) (Fig. 15).

Figura 15. Rendimento (em %) dos extratos liofilizados de *M. aquaticum* a partir das soluções hidroetanólica e aquosa. \*Indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey ( $n=3$ ).



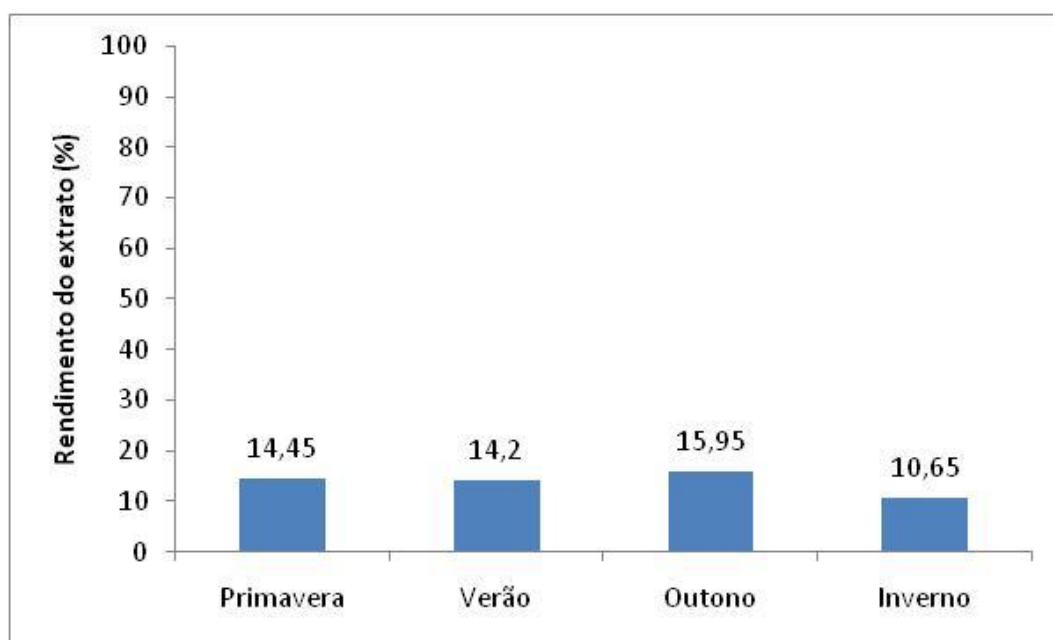
Fonte: autoria própria

A partir de 20 g de pó de planta seco, foi obtida a massa liofilizada equivalente a 3,03 g ( $\pm 0,06$ ) para o extrato hidroetanólico e 1,65 g ( $\pm 0,08$ ) para o extrato aquoso. Silveira (2012), ao estudar o rendimento de extratos provenientes de macrófitas aquáticas, cita que as diferenças obtidas, possivelmente podem estar relacionadas aos compostos solúveis extraídos pela solução extratora. Matos (2009)

explica que compostos mais polares e hidrofílicos são extraídos com maior facilidade com a utilização de soluções hidroetanólica e hidrometanólica, o que justifica os maiores rendimentos observados na presente pesquisa.

Ainda, foram calculados os rendimentos dos extratos hidroetanólicos para a comparação sazonal. Dentre os resultados, foi verificado que a estação outono obteve maiores rendimentos, seguida por verão, primavera e inverno (Fig. 16). A partir de 20 g de pó de planta, foram obtidos, respectivamente 3,19; 2,89; 2,84 e; 2,13 g de pó liofilizado para outono, verão, primavera e inverno.

**Figura 16. Comparação sazonal do rendimento dos extratos liofilizados de *Myriophyllum aquaticum* a partir das soluções hidroetanólica e aquosa (n=1)**



Fonte: autoria própria

Oliveira et al. (2016) ao estudar diferentes técnicas e solventes para a maior eficiência de extração e rendimento de extratos vegetais de *Dicksonia sellowiana*, constataram que o solvente hidroetanólico foi o mais eficiente (em rendimento de extração), independente da técnica extrativa a ser utilizada. Além disso, os autores citam que tal solvente pode extrair compostos com caráter mais polar, como taninos (hidrolisáveis e condensados) e flavonoides glicosilados (como os derivados de quercetina). Tais informações corroboram para os valores de rendimentos obtidos na presente pesquisa.

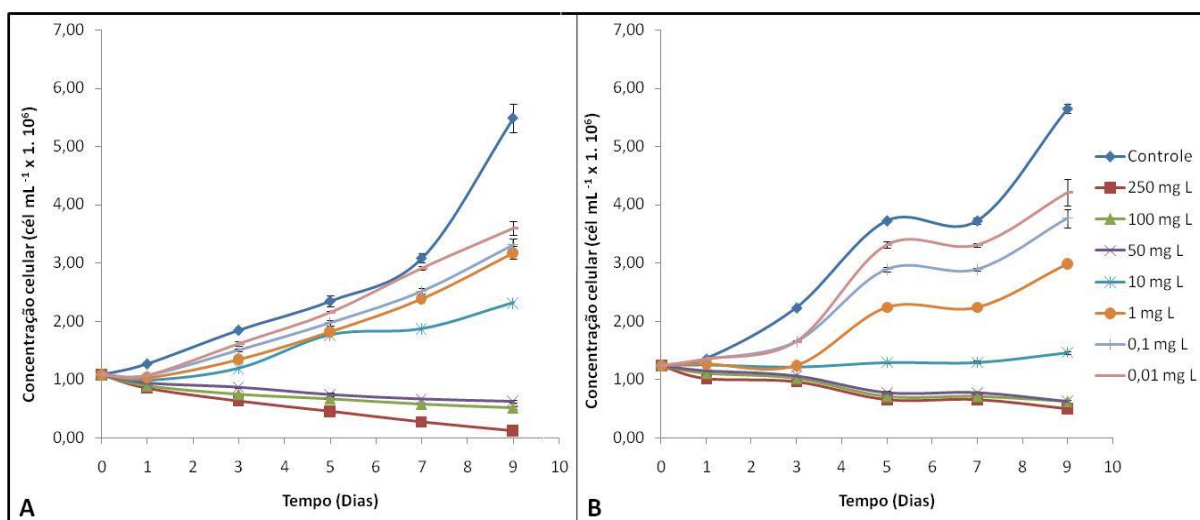
### 6.3 Exposição de cultivos de *M. aeruginosa* a extratos de *M. aquaticum*

#### 6.3.1 Efeitos no crescimento e viabilidade celular de *M. aeruginosa*

Constatou-se que o extrato aquoso e hidroetanólico apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento celular de *M. aeruginosa*. As maiores atividades ocorreram nas concentrações acima de 50 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 17).

Houve diferença significativa para todas as concentrações-teste do extrato aquoso ( $p < 0,0005$ ), e para o extrato hidroetanólico ( $p < 0,0049$ ) quando comparadas ao controle no nono dia (Fig.17). As concentrações acima de 50 mg L<sup>-1</sup> apresentaram inibição de crescimento celular a partir do terceiro dia de exposição.

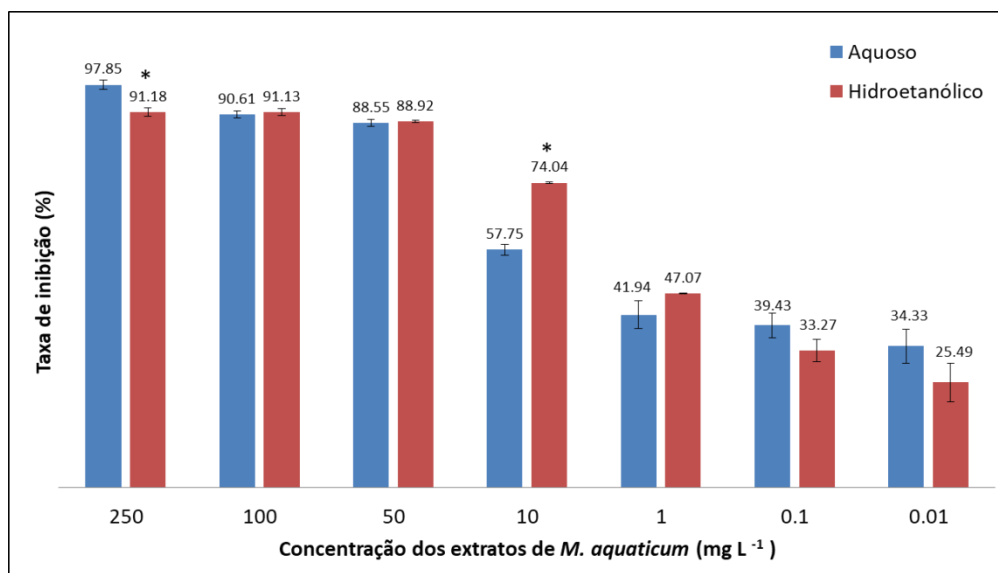
**Figura 17. Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso (A) e hidroetanólico (B) de *Myriophyllum aquaticum* (n=3).**



Fonte: autoria própria

Com o intuito de analisar a diferença de efeito inibitório entre os extratos (aquoso e hidroetanólico), foram calculados os percentuais de inibição em relação ao controle, no último dia de exposição (Fig. 18).

Figura 18. Taxa de inibição de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia (9º dia) experimental (n=3). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os extratos, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

O extrato aquoso apresentou efeito inibitório sobre *M. aeruginosa* com inibições mínimas e máximas de 34,33 a 97,85 enquanto que para o extrato hidroetanólico, foi possível verificar percentuais entre 25,42 a 91,18%. Foi possível constatar diferença significativa entre o extrato aquoso, quando comparado ao extrato hidroetanólico, nas concentrações de 250 ( $p=0,000293$ ) (maiores inibições para o extrato aquoso) e 10 mg L<sup>-1</sup> ( $p=0,000297$ ) (maiores inibições para o extrato hidroetanólico).

Sabe-se que o uso de diferentes solventes no processo de extração de plantas permite a obtenção de uma variedade maior de compostos. Soluções hidroalcoólicas e etanólicas, por exemplo, podem extrair ácidos fenólicos, flavonóis, saponina e taninos. Já na extração utilizando apenas água, podem-se obter taninos hidrolisáveis e heterosídeos. Muitos desses compostos apresentam atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2010).

Alguns trabalhos avaliaram a influência das macrófitas sobre as cianobactérias, seja em experimentos utilizando a planta viva, como em experimentos utilizando extratos vegetais. Ghobrial, Nassr e Camil (2015) encontraram taxas de inibições de 99,80%, após um período de cinco dias, com a aplicação de extratos hidroetanólicos da espécie vegetal *Potamogeton pectinatus*

sobre *M. aeruginosa* e 94,60% para *Ceratophyllum demersum*. Eles ainda citam que a utilização de solução hidroetanólica e acetona, permitiu a extração de compostos que contribuem na inibição de cianobactérias, como *M. aeruginosa*, fator que pode contribuir para a atividade observada na presente pesquisa.

Li et al. (2016) estudaram o efeito do extrato aquoso da macrófita *Sagittaria trifolia* sobre *M. aeruginosa* e verificaram que em seis dias, ocorreram inibições de 90%. No estudo, os autores verificaram que o extrato atuou sobre as atividades enzimáticas da superóxido dismutase, peroxidase e redução de glutationas nas células de *M. aeruginosa*, o que pode estar relacionado com danos às membranas celulares. Meng et al. (2015), realizaram testes de inibição com extrato hidroetanólico de *Alianthus altíssima*. Estes autores obtiveram maior eficácia no tratamento com 200 mg L<sup>-1</sup>, com taxas de inibição de 91,80%.

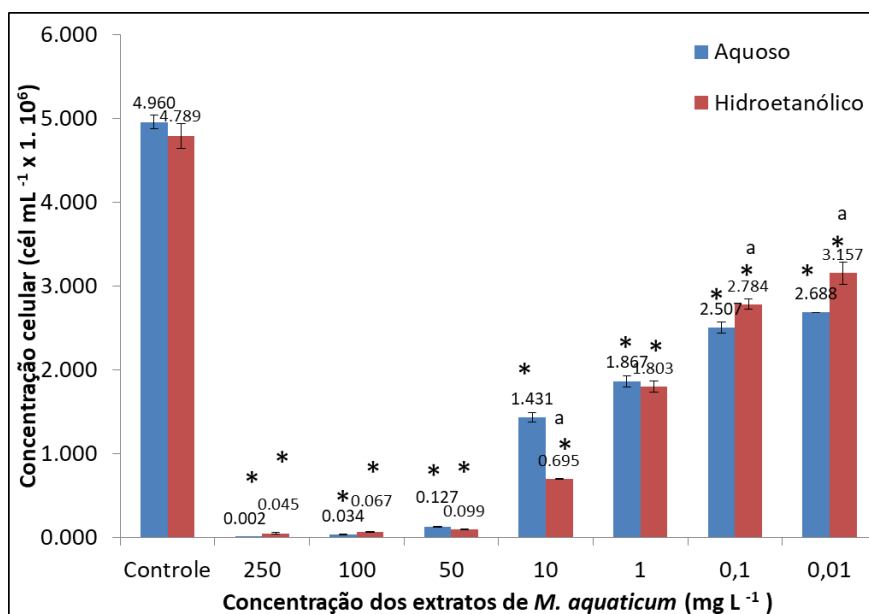
Tais estudos demonstram a ação de extratos das macrófitas aquáticas submersas para a inibição de *M. aeruginosa*, corroborando com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Com o intuito de verificar se a propriedade inibitória constatada ao longo do período de exposição consistia em efeito algicida (morte celular) ou algistático (inibição transitória da fisiologia celular), fez-se a inoculação a partir dos recipientes-teste no nono dia de exposição de modo a averiguar a viabilidade celular de *M. aeruginosa* (item 5.3.4)

Verificou-se que o crescimento celular após a reinoculação apresentou relação com o percentual de inibição. Desta forma, constatou-se o efeito algistático dos extratos, visto que houve crescimento celular posterior ao período de exposição (Fig. 19).

Constatou-se que para o extrato aquoso, ocorreram maiores efeitos algistáticos para as concentrações de acima de 50 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados ao controle ( $p \leq 0,00017$ ). Para o extrato hidroetanólico os efeitos mais significativos foram constatados para as concentrações acima de 10mg L<sup>-1</sup>, com diferenças significativas em relação ao controle ( $p \leq 0,00002$ ). Ao comparar os extratos, foi possível verificar que ocorreram diferenças significativas, para as concentrações de 10, 0,1 e 0,01 mg L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,0066$ ).

Figura 19. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias de inoculação para verificação da viabilidade celular após a aplicação de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os extratos e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ( $n=3$ ).



Fonte: autoria própria

Shao et al. (2013), citam que substâncias derivadas de macrófitas podem variar o seu efeito algicida/algistático, conforme a concentração do aleloquímico empregado. Tais afirmações corroboram com os resultados observados, visto que conforme aumentou a concentração de extrato de *M. aquaticum*, foram constatadas menores concentrações celulares, o que pode estar relacionado com maiores efeitos algistáticos sobre *M. aeruginosa*. Ainda, vale ressaltar que, os dados obtidos de inibição celular, correspondem com a concentração celular de *M. aeruginosa* nos testes de viabilidade, demonstrando a bioatividade dos extratos sobre o crescimento da cianobactéria.

### 6.3.2 Concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de *M. aquaticum*

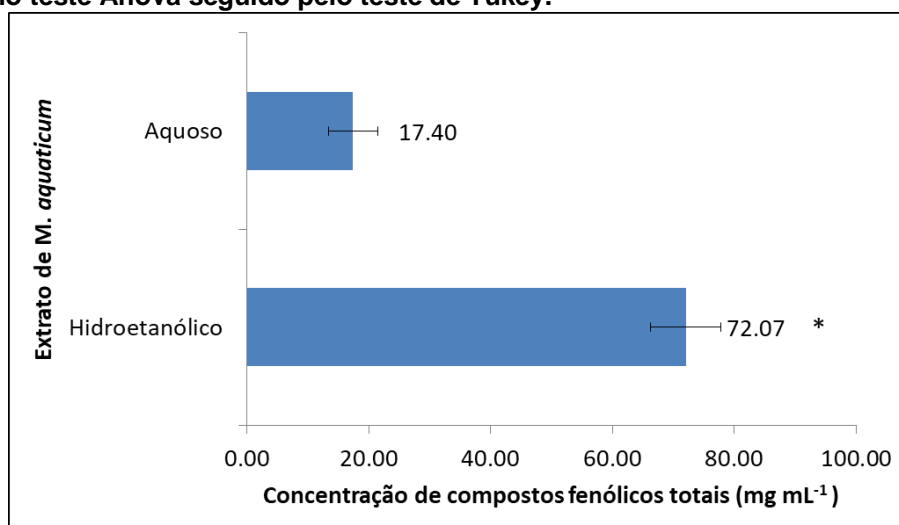
Sabe-se que o grupo dos compostos fenólicos apresentam atividades inibitórias em cianobactérias (GROSS, 2000; GROSS et al., 2003). Sendo assim,



fez-se a caracterização dos extratos em relação ao teor de compostos fenólicos totais.

Foi constatado que o extrato hidroetanólico e o extrato aquoso apresentaram em sua composição a presença de compostos fenólicos. Entretanto, o extrato hidroetanólico apresentou maiores concentrações, quando comparadas ao aquoso, ocorrendo diferença estatística ( $p=0,0004$ ) (Fig. 20).

**Figura 20. Concentração de compostos fenólicos totais ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) dos extratos de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). \*Indica diferença significativa ( $p<0,05$ ), quando comparados os extratos pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey.**



Fonte: autoria própria

Simões et al. (2010) afirmam que soluções de solventes orgânicos misturados com água, aumentam o rendimento de extração de compostos fenólicos. Tal fato pode ser observado na presente pesquisa, visto que, além de maiores percentuais de rendimento dos extratos, foram verificadas maiores concentrações de compostos fenólicos para o extrato hidroetanólico.

Alguns autores constataram que o gênero *Myriophyllum* apresenta, como principais classes de compostos bioativos, os compostos fenólicos (NAKAI et al., 1996; NAKAI et al., 2000; NAKAI et al., 2012; ZHU et al., 2010). Bauer et al. (2009) citam que *Myriophyllum verticillatum* apresentou correlação entre as maiores concentrações de compostos fenólicos totais e a atividade alelopática sobre a cianobactéria *Anabaena variabilis*. Após analisarem esses compostos por HPLC-DAD, os autores encontraram que as classes químicas relacionadas à atividade inibitória foram os elagitaninos, sendo o principal biomarcador de atividade o composto majoritário tellimagrandin II.

Saito et al. (1989), ao estudarem *Myriophyllum brasiliense* (sinonímia científica para a espécie *M. aquaticum*), observaram que os grupos de taninos e flavonoides apresentaram bioatividade sobre as cianobactérias *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*. Lu et al. (2017) ao estudarem os efeitos do ácido pirogálico, verificaram que o composto em solução aquosa, estimulou potencialmente a produção de espécies reativas de oxigênio, desencadeando o início da morte celular programada de *M. aeruginosa*.

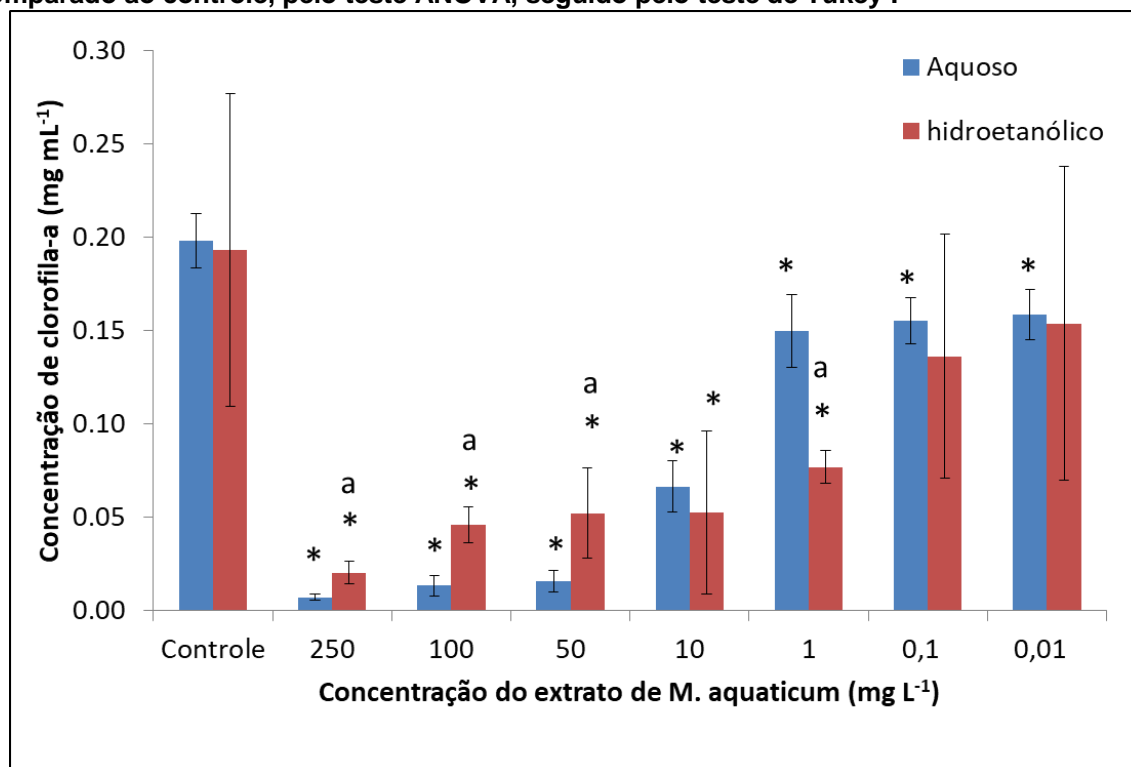
### 6.3.3 Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos

De modo a compreender a interferência dos extratos de *M. aquaticum* sobre os pigmentos fotossintéticos de *M. aeruginosa*, foram analisados os teores de clorofila-*a* (item 5.2.3 da metodologia) e dos pigmentos acessórios (item 5.2.4 da metodologia). Nas cianobactérias, os ficobilissomos são centro de reações que realizam a conversão de energia solar em elétrons no processo de fotossíntese, no fotossistema II. Os ficobilissomos são constituídos de pigmentos acessórios, principalmente por ficoeririna, ficocianina e aloficocianina. A radiação solar é absorvida pela ficoeritrina e transmitida para as ficocianinas. Esses pigmentos são responsáveis por transmitir os elétrons para o centro de reação do ficobilissomo, onde estarão presentes as aloficocianinas. Posteriormente, esses pigmentos transmitirão os elétrons para a membrana da tilacóide e então, a clorofila-*a* será a acceptora final desses elétrons no fotossistema I, para que então o processo de fotossíntese seja finalizado (GLAZER, 1989, MACCOLL, 2018). Deste modo, interferências sobre estes pigmentos podem demonstrar possíveis efeitos sobre o potencial fotossintético das cianobactérias, o que realça a importância das análises realizadas na presente pesquisa.

Os dois extratos testados apresentaram efeitos sobre o teor de clorofila-*a*, após o período de exposição (Fig. 21). Constatou-se que todas as concentrações-testes do extrato aquoso apresentaram efeitos significativos, quando comparados com o controle ( $p \leq 0,0001$ ). Para o extrato hidroetanólico, foi verificada diferença significativa para as concentrações de 1 a 250 mg L<sup>-1</sup>. Ao comparar os extratos, constatou-se que de 50 a 250 mg L<sup>-1</sup>, o extrato aquoso apresentou menores concentrações de clorofila-*a*, quando comparados ao extrato hidroetanólico

( $p \leq 0,0005$ ), enquanto que para a concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  foram constatadas menores concentrações do pigmento para o extrato hidroetanólico ( $p=0,0001$ ).

**Figura 21. Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após exposição a diferentes concentrações de extratos aquoso e hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os extratos e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey .**



Fonte: autoria própria

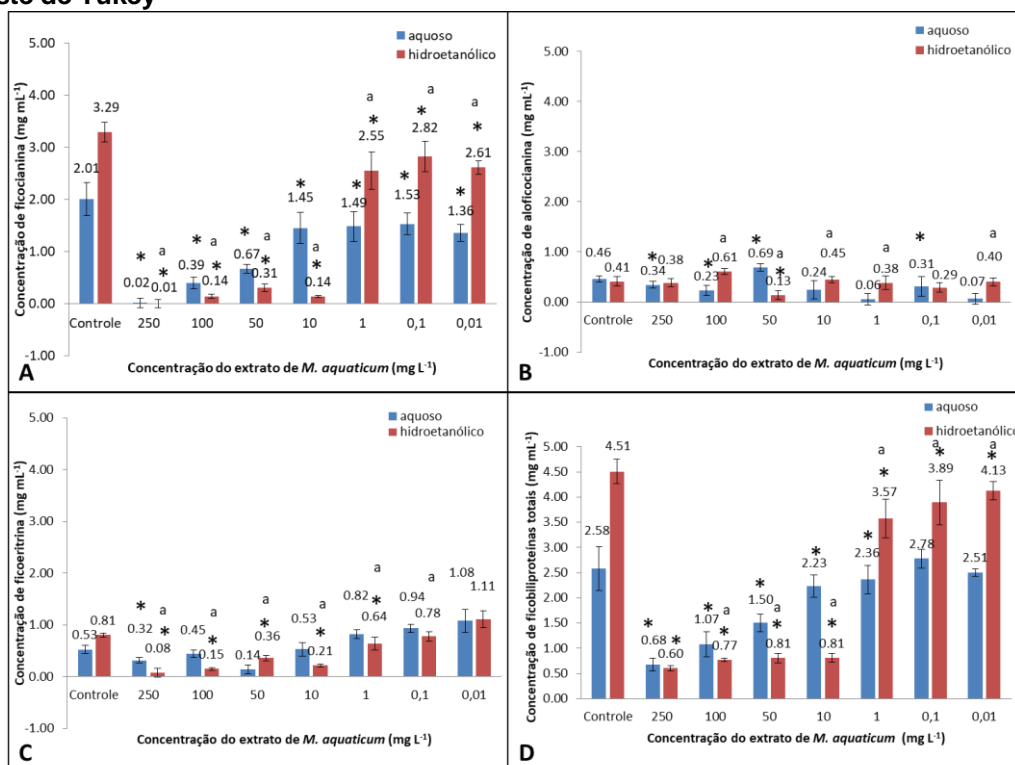
As concentrações em que foram observadas maiores reduções de clorofila-a, em ambos os extratos, estão relacionadas com as concentrações em que foram obtidos os maiores valores de inibição.

No que se refere aos pigmentos acessórios foi possível também constatar interferência sobre sua produção, principalmente nas maiores concentrações de extratos ( $50$  a  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ), conforme apresentado na figura 22. Os pigmentos que obtiveram maiores relações dos efeitos com a inibição da cianobactéria foram ficocianina, ficoeritrina e ficobiliproteínas totais

A concentração de ficocianina (Fig. 22A), quando comparado com o controle, apresentou diferença significativa para todas as concentrações-testes ( $p < 0,00007$ ). Constatou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de aloficocianina (Fig. 22B) para as concentrações de  $250$ ,  $100$ ,  $50$ ,  $10$  e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Para ficoeritrina (Fig.22C), foi verificada redução significativa nas concentrações do

extrato aquoso de 250 e 50 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados ao controle (p=0,00001). Referente à concentração de ficobiliproteínas totais (Fig 22D), foi observada redução significativa nas concentrações de extrato de 50 a 250 mg L<sup>-1</sup> (p≤0,0001).

**Figura 22. Concentrações de pigmentos acessórios de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum*: A) Ficocianina; B) Alociocianina; C) Ficoeritrina e; D) Ficobiliproteínas totais (n=3). \*Indica diferença significativa (p<0,05), quando comparados ao controle pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey**



Fonte: autoria própria

Para o extrato hidroetanólico, as concentrações de 10 a 250 mg L<sup>-1</sup> apresentaram maiores efeitos na redução de ficocianina (Fig 22A), quando comparados ao controle (p≤0,000127). Para alociocianina (Fig. 22B), foi verificado efeito significativo na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> (p=0,000128), enquanto que para as outras concentrações, não foi verificada diferenças significativas quando comparadas ao controle. O extrato hidroetanólico ainda, atuou na redução de ficoeritrina (Fig. 22C), com diferenças significativas nas concentrações entre 1 a 250 mg L<sup>-1</sup> (p<0,012). Referente ao teor de ficobiliproteínas totais (Fig. 22D) foi constatado redução significativa para todas as concentrações-teste, quando comparados ao controle (p<0,02).

Ao comparar os dois extratos, constatou-se que o extrato hidroetanólico apresentou menores concentrações de ficocianina (p≤0,01), ficoeritrina (p≤0,001) e

ficobiliproteínas totais ( $p \leq 0,003$ ), quando comparadas ao extrato aquoso, principalmente entre as concentrações de 10 a 250 mg L<sup>-1</sup>. Para aloficocianina, é possível observar diferenças significativa entre 1 a 100 mg L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,02$ ). Verificou-se que, dentre os pigmentos analisados, ficocianina apresentou maiores influências sobre a composição de ficobiliproteínas totais e, os efeitos relacionados à redução das concentrações após a adição dos extratos, demonstram que há uma interferência direta sobre os pigmentos acessórios de *M. aeruginosa*, principalmente do extrato hidroetanólico.

Alguns trabalhos sugerem que macrófitas aquáticas submersas apresentam interferência sobre seus pigmentos fotossintetizantes e fotossistemas a partir de espécies de cianobactérias. Cheng et al. (2008), quando cultivaram *M. aquaticum* por um período de 30 dias e, posteriormente, filtraram o meio de cultivo da macrófitas e aplicou o mesmo, como algicida. Neste trabalho, ele constatou a inibição de *M. aeruginosa* e principalmente efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos, como a ficocianina, aloficocianina e clorofila-a. Tais pigmentos quando afetados, causam a interferência na fotossíntese da cianobactéria, visto que são responsáveis pela absorção de comprimentos de onda de 490 a 660 nm.

Meng et al. (2015), ao estudarem o extrato hidroetanólico da macrófitas *Alianthus altíssima*, para a inibição de *M. aeruginosa*, constatou redução do teor de clorofila-a da cianobactéria. O uso do extrato contribuiu para a inibição fotossintética e a síntese de proteínas, ocasionando a desregulação do metabolismo fisiológico das células em estudo.

Gross, Erhard e Yvanyi (2003), relatam que há uma correlação forte entre os compostos fenólicos liberados por macrófitas aquáticas submersas, com a interferência nos pigmentos fotossintéticos e inibição celular de cianobactérias, o que corrobora para os resultados obtidos na presente pesquisa.

Aleloquímicos pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, estudados em *Myriophyllum spicatum*, como o tellimagrandim II, quando em contato com as células das cianobactérias afetam diretamente o fotossistema II, degradando os pigmentos acessórios ou interferindo na atividade dos mesmos, além de causar a morte celular por inibição de enzimas como a fosfatase alcalina (LEU et al., 2002). Zhu et al. (2010), ao aplicarem catequinas, ácidos gálico e elágico isolados (compostos fenólicos) de *M. spicatum*, foi verificaram a interferência sobre o aparato

fotossintético de *M. aeruginosa*, principalmente sobre o fotossistema II, devido às reduções na transdução de elétrons na fase escura da fotossíntese.

Visto que ocorreram efeitos significativos sobre os pigmentos acessórios e clorofila-a, é possível constatar que os extratos apresentaram efeitos sobre o potencial fotossintético, principalmente nas maiores concentrações de extrato.

#### 6.3.4 Efeitos na concentração de microcistina-LR

Com o intuito de avaliar o efeito da inibição dos extratos de *M. aquaticum* sobre as concentrações de microcistina-LR, foram analisadas amostras provenientes do último dia experimental (nono dia). Em trabalhos anteriores, Torres (2016) realizou a caracterização da produção de microcistina-LR, demonstrando que há produção da cianotoxina pela cepa de *M. aeruginosa* utilizada na presente pesquisa.

Os extratos de *M. aquaticum* apresentaram efeitos sobre a concentração de microcistina-LR após nove dias de experimento (Tab. 2).

O extrato aquoso interferiu na concentração de microcistina-LR total, principalmente nas maiores concentrações (50 a 250 mg L<sup>-1</sup>) ( $p < 0,008$ ) quando comparadas ao controle (Tab. 2). Nota-se que houve redução na produção para essas três concentrações de 98,77%, 96,06% e 90,38%, respectivamente. Para o extrato hidroetanólico foi verificada redução de microcistina-LR para as concentrações de 10 a 250 mg L<sup>-1</sup>, com diferenças significativas, quando comparadas ao controle ( $p \leq 0,001$ ). Observa-se que ocorreu redução de concentração da cianotoxina de 94,63%, 94,89%, 90,27% e 81,42%, respectivamente para as concentrações citadas anteriormente (Tab. 2).

Ao realizar a comparação entre os extratos é possível verificar que a o extrato hidroetanólico apresentou menores concentrações de microcistina-LR, quando comparado ao extrato aquoso ( $p = 0,0035$ ). Já para o percentual de redução, constatou-se que na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> o extrato aquoso apresentou maiores reduções da cianotoxinas ( $p = 0,0419$ ). O extrato hidroetanólico, no entanto, apresentou maiores reduções nas concentrações intermediárias, principalmente na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> em que foram observadas diferenças significativas, quando comparado com o extrato aquoso ( $p = 0,0007$ ).

**Tabela 2. Concentração de microcistina-LR total no último dia experimental (9º Dia) após a adição de extrato aquoso e hidroetanólico de *M. aquaticum* sobre cultivos de *M. aeruginosa* (n=3)**

Tratamento (mg L)	Microcistina-LR total ( $\mu\text{g L}$ )		% de redução	
	Aquoso (a)	Hidroetanólico (b)	Aquoso (a)	Hidroetanólico (b)
Controle	0,229 $\pm$ 0,050	0,247 $\pm$ 0,050	-	-
250	0,003 $\pm$ 0,003*	0,014 $\pm$ 0,007*	98,77 <sup>b</sup>	94,63 <sup>a</sup>
100	0,012 $\pm$ 0,012*	0,021 $\pm$ 0,001*	96,06	94,89
50	0,022 $\pm$ 0,010*	0,025 $\pm$ 0,002*	90,38	90,27
10	0,181 $\pm$ 0,036 <sup>b</sup>	0,047 $\pm$ 0,008 <sup>*a</sup>	21,58 <sup>b</sup>	81,42 <sup>a</sup>
1	0,210 $\pm$ 0,024	0,205 $\pm$ 0,065	7,44	19,17
0,1	0,209 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	0,290 $\pm$ 0,043 <sup>a</sup>	7,87	↑4,75
0,01	0,230 $\pm$ 0,015	0,214 $\pm$ 0,047	↑0,92	↑10,60

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os extratos e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ↑ indica aumento da concentração de microcistina-LR

De modo a avaliar se houve estímulo ou inibição na produção de microcistina-LR por unidade celular, foram calculados os valores, dividindo a concentração total da cianotoxina pelo número da concentração celular, de modo a averiguar se, de fato, ocorreria uma normalização dos dados, visto que ao final do experimento, o número de células foi menor para as maiores concentrações de células (Tab. 3).

Os extratos aquoso e hidroetanólico apresentaram menores concentrações de microcistina-LR por célula nas concentrações de 50 a 250 mg L<sup>-1</sup>, porém, não apresentaram diferenças significativas com o controle. Ao comparar os efeitos dos extratos, foi possível verificar que o extrato hidroetanólico apresentou menores concentrações com diferenças significativas, quando comparados ao controle na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> ( $p=0,006$ ), bem como maiores percentuais de redução da cianotoxinas ( $p=0,0018$ ) (Tab. 3). Entretanto, pela análise das concentrações entre 0,01 a 10 mg L<sup>-1</sup> para o extrato aquoso e de 0,01 a 1 mg L<sup>-1</sup>, é possível verificar o aumento na produção das toxinas, com valores acima de 50%, o que demanda atenção para as concentrações de extrato a serem utilizadas.

Meng et al., (2015), ao estudarem a aplicação de extratos hidroetanólicos de *Alanthus altíssima* sobre *M. aeruginosa*, verificaram que no tratamento, principalmente com 200 mg L<sup>-1</sup> ocorreu menor produção de microcistina-LR que o tratamento controle (sem adição do extrato). Os autores indicam que além de causar danos às células da cianobactéria, o extrato é capaz de degradar as toxinas também.

**Tabela 3. Concentração de microcistina-LR por célula no último dia experimental (9º Dia) após a adição de extrato aquoso e hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* sobre cultivos de *M. aeruginosa* (n=3)**

Tratamento (mg L <sup>-1</sup> )	Microcistina-LR por célula (ng L <sup>-1</sup> )		% de redução	
	Aquoso	Hidroetanólico	Aquoso	Hidroetanólico
Controle	41,79 ± 4,35	45,80 ± 6,73	-	-
250	22,47 ± 23,39	28,37 ± 12,87	45,65 <sup>b</sup>	39,24 <sup>a</sup>
100	24,08 ± 34,39	42,64 ± 3,13	57,73 <sup>b</sup>	10,22 <sup>a</sup>
50	34,39 ± 15,31	39,67 ± 1,20	17,79	11,97
10	77,88 ± 14,22 <sup>b</sup>	31,83 ± 5,15 <sup>a</sup>	↑85,41 <sup>b</sup>	28,53 <sup>a</sup>
1	66,25 ± 8,78	68,40 ± 20,98	↑60,84	↑52,66
0,1	63,17 ± 1,10	69,82 ± 6,62	↑52,06	↑56,28
0,01	63,87 ± 4,22	65,36 ± 7,56	↑54,06	↑46,72

Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os extratos, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ↑indica aumento da concentração de microcistina-LR

Dziga et al. (2007), constataram aumento na produção de microcistina, após a aplicação de compostos fenólicos provenientes de macrófitas aquáticas submersas, principalmente com a hidroquinona. Os autores relatam que, apesar de redução da biomassa de *M. aeruginosa*, a hidroquinona aumentou o nível de cianotoxinas disponibilizada no meio, demandando atenção principalmente referente às concentrações dos aleloquímicos aplicados, pois este é um fator que pode corroborar para a maior liberação de cianotoxinas no meio.

Na presente pesquisa foi constatada redução de microcistina-LR principalmente nas maiores concentrações de extrato utilizado, tanto no extrato aquoso, quanto no hidroetanólico, demonstrando que os compostos presentes em *M. aquaticum* podem reduzir a quantidade de microcistina-LR no meio. Porém, demanda-se atenção sobre as menores concentrações de extrato, visto que ocorreram aumentos nas concentrações das toxinas por célula, principalmente nas concentrações entre 0,01 a 1 mg L<sup>-1</sup>, mesmo ocorrendo inibições celulares.

#### **6.4 Comparação sazonal dos efeitos inibitórios do extrato hidroetanólico de *M. aquaticum***

O intuito do presente experimento, foi avaliar se, ocorreria variações entre as estações do ano, sobre a inibição celular, de pigmentos fotossintéticos, microcistina-LR e até mesmo, variações na composição de compostos fenólicos dos extratos.



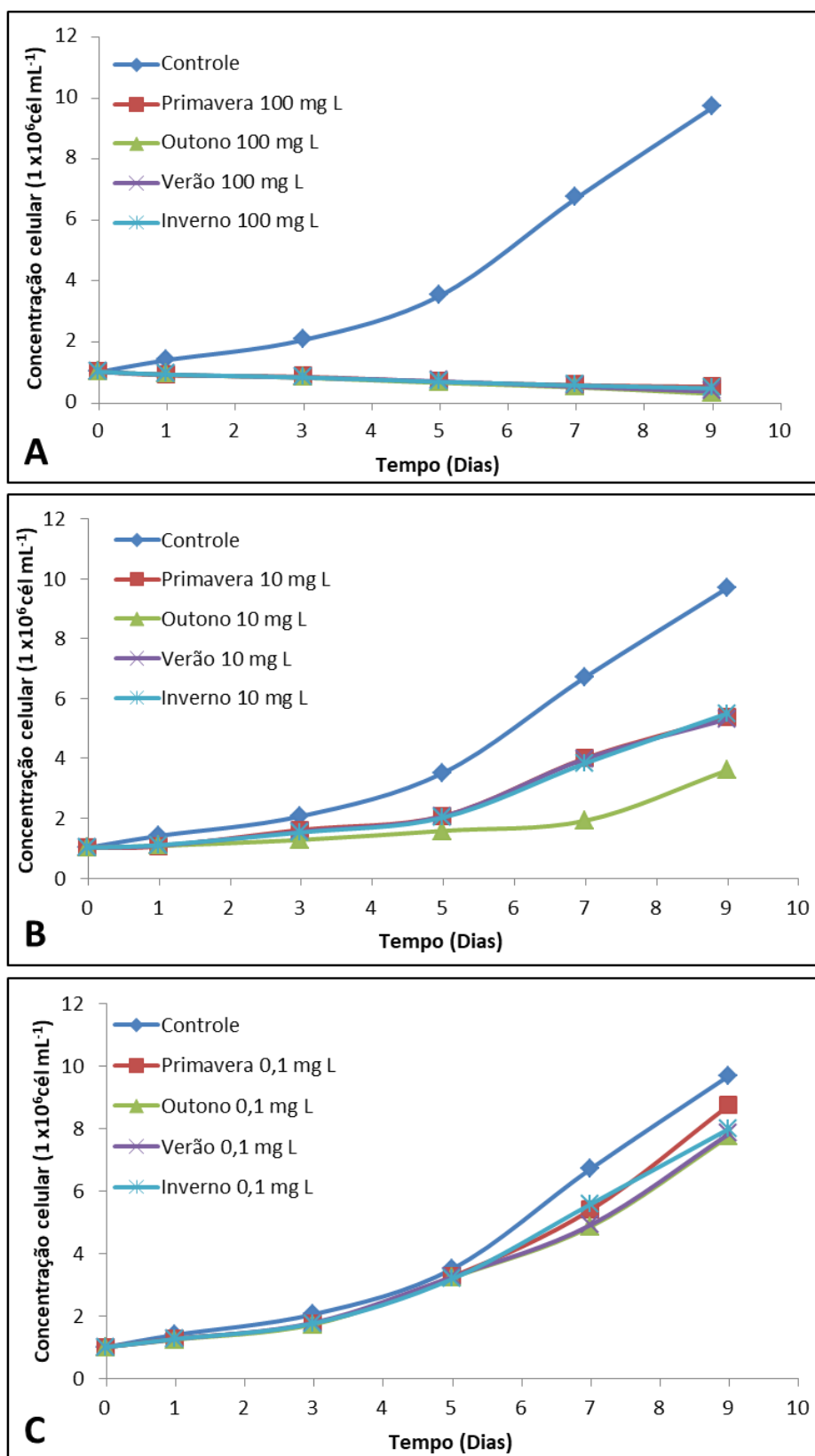
Além disso, visto que nos experimentos de comparação entre as soluções extratoras, o extrato hidroetanólico apresentou maiores rendimentos e maiores efeitos bioativos em concentrações intermediárias de extrato, optou-se por desenvolver a comparação sazonal apenas com esta solução extratora, bem como trabalhar apenas com três concentrações: alta ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), média ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e baixa ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) de modo a verificar se ocorreria alguma alteração entre as quatro estações.

#### 6.4.1 Efeitos no crescimento celular e na viabilidade de *M. aeruginosa*

Verificou-se que houve interferência dos extratos sobre o crescimento de *M. aeruginosa* para o extrato em todas as estações. Dentre as estações que obtiveram maiores interferências, principalmente na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , está inverno e outono (Fig. 23).

Para todas as estações, foi verificado que o uso do extrato hidroetanólico apresentou efeito significativo sobre o crescimento de *M. aeruginosa*, quando comparados ao controle. Nota-se que a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  exerceu interferência direta sobre a cianobactéria, impedindo seu crescimento durante o período experimental. Entretanto, verifica-se que a estação de primavera apresentou menores interferências sobre o crescimento quando comparados às outras estações ( $p=0,0001$ ) nas concentrações de  $10$  e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ .

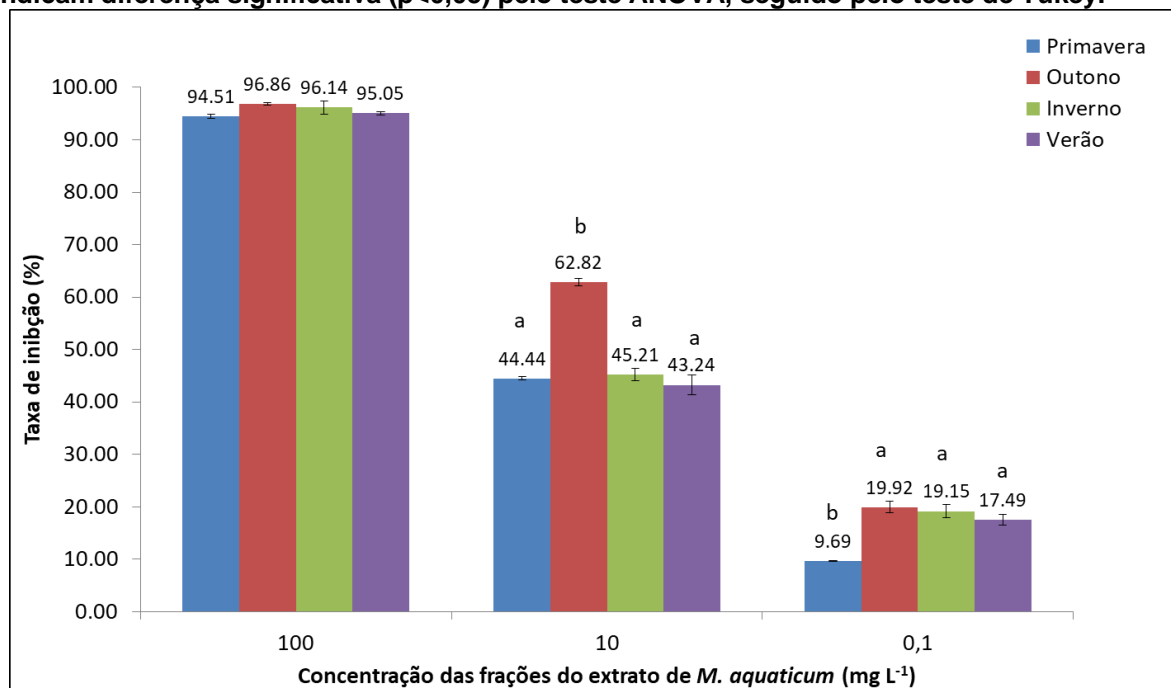
Figura 23. Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* após a adição de extrato hidroetanólico (80% v/v) de *Myriophyllum aquaticum* coletadas nas estações de primavera, outono, inverno e verão, em diferentes concentrações (mg L<sup>-1</sup>): 100 (A); 10 (B) e 0,1 (n=3).



Fonte: autoria própria

Referente às taxas de inibição, foi verificado que a estação de outono apresentou os maiores percentuais, quando comparada às outras estações, com diferenças significativas para a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (p=0,00014) (Fig. 24).

**Figura 24.** Taxa de inibição de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



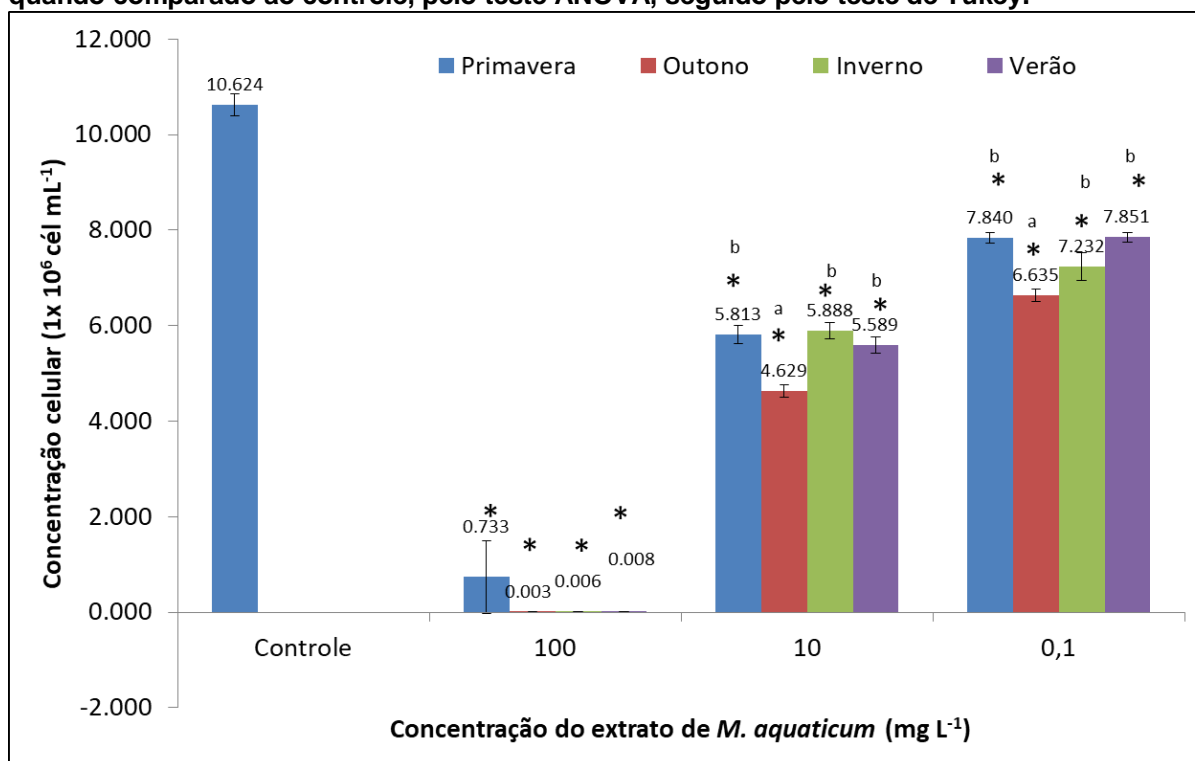
Fonte: autoria própria

Para a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, é possível constatar que dentre as quatro estações em estudo, primavera apresentou as menores taxas de inibição, com diferença significativa, quando comparada às outras estações (p=0,00014).

Diante desses resultados, é possível verificar que a estação de primavera apresentou as menores taxas de inibição, quando comparadas às outras estações. Além disso, é possível verificar que outono apresentou maior potencial para a inibição de *M. aeruginosa*, visto que em todas as concentrações obteve as maiores taxas, e na concentração intermediária de 10 mg L<sup>-1</sup> ocorreu diferença significativa, quando comparado às outras estações.

Para as análises de viabilidade celular, foi constatado que após a reinoculação houve relação com o percentual de inibição, pois o crescimento celular apresentou potencial algistático, após o uso dos extratos (Fig. 25).

Figura 25. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias para verificação da viabilidade celular após a adição de diferentes concentrações de hidroetanólico 80% (de *Myriophyllum aquaticum* para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



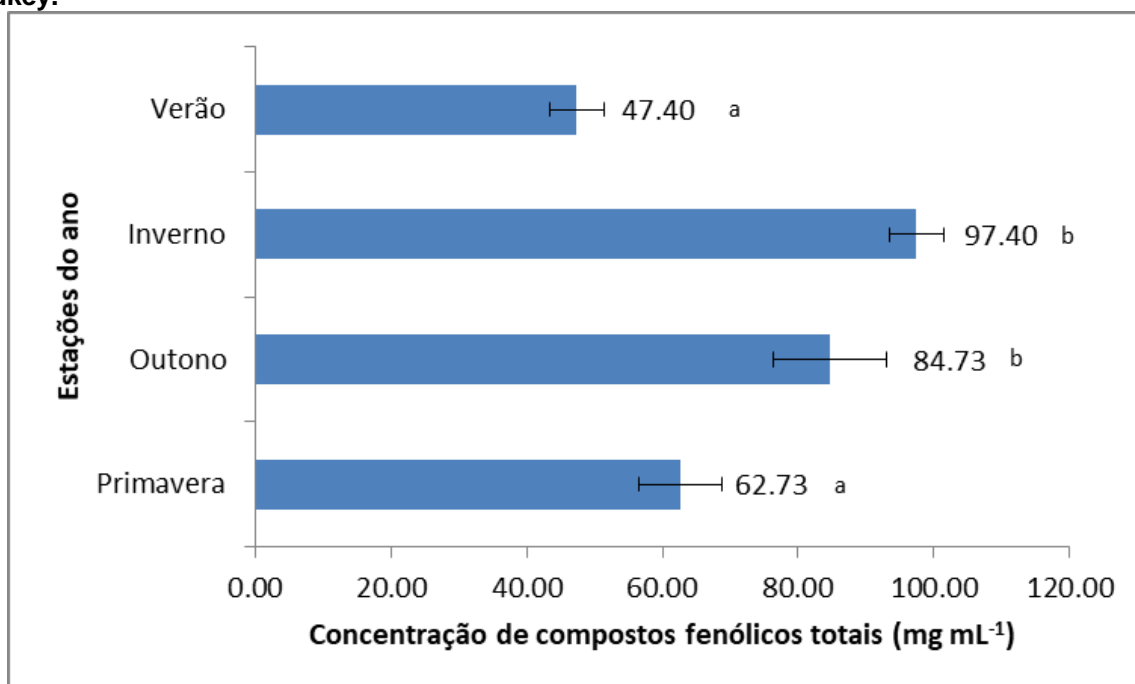
Fonte: autoria própria

Dentre os tratamentos apresentados, houve diferenças significativas para todas as concentrações de extrato e estações ( $p=0,0015$ ) quando comparados ao controle. A estação que apresentou maiores efeitos, quando comparada às outras, foi outono, apresentando diferenças significativas, principalmente, nas concentrações de 10 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

#### 6.4.2 Concentração de compostos fenólicos totais dos extratos hidroetanólicos de *M. aquaticum*.

Foram observadas diferenças significativas nas concentrações de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico, ao comparar as estações. As estações de outono e inverno apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais, quando comparadas às estações de verão e primavera ( $p < 0,0007$ ) (Fig. 26).

Figura 26. Comparação sazonal da concentração de compostos fenólicos totais ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) do extrato hidroetanólico (80% v/v) de *Myriophyllum aquaticum* ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as estações, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

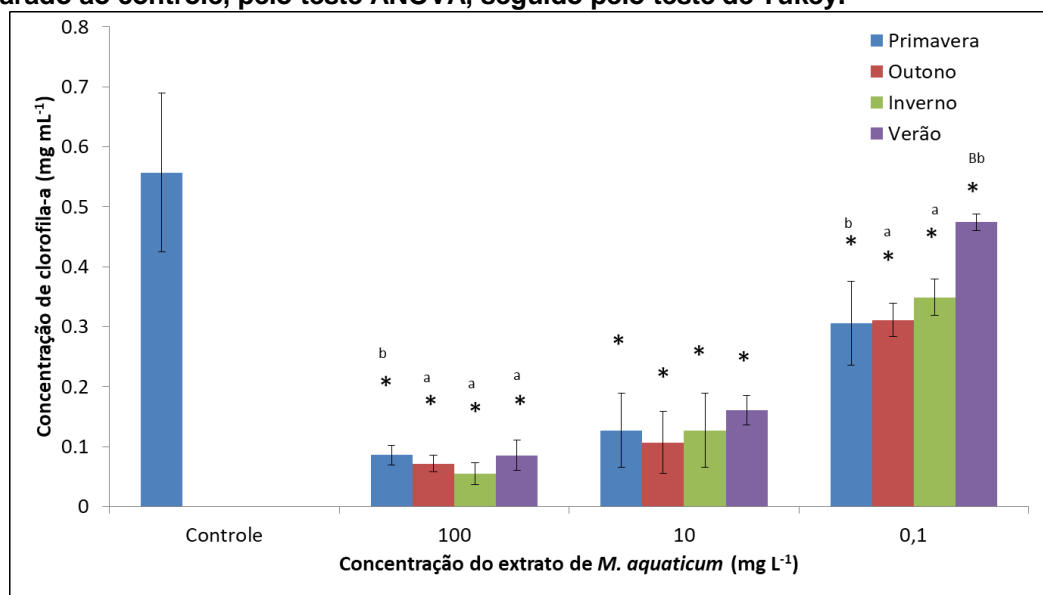
Bauer et al. (2009) citam que há a variação no teor de compostos fenólicos totais durante a dinâmica sazonal do ciclo de vida de *Myriophyllum verticillatum*. Nos meses de maio a julho, há maior liberação de compostos fenólicos nas partes apicais da macrófitas, o que pode estar associado com inibições da cianobactéria *Anabaena flos-aquae*. Tais informações corroboram para os resultados obtidos na presente pesquisa, visto que o período da estação seca (outono e inverno) apresentou em geral as maiores taxas de inibição, período que está compreendido dentro da faixa sazonal em que os autores obtiveram maiores teores de compostos fenólicos. Os autores, ainda, inferem a relação entre a diferença na concentração de compostos fenólicos com a disponibilidade de nutrientes e luz no ambiente em que a macrófitas estão presentes.

As maiores atividades inibitórias e os maiores efeitos sobre a viabilidade celular, podem estar relacionadas com as maiores concentrações de compostos fenólicos totais, visto que os resultados das estações de outono e inverno, que obtiveram maiores concentrações de compostos fenólicos, apresentaram maior bioatividade. Deste modo, verifica-se que pode existir uma relação direta entre a atividade desses compostos de *M. aquaticum* sobre a inibição de *M. aeruginosa*.

### 6.4.3 Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos

Foi verificado que o extrato hidroetanólico de todas as estações apresentou efeitos sobre a produção de clorofila-a de *M. aeruginosa*. Em todas as concentrações-testes foram obtidas reduções significativas das concentrações do pigmento, quando comparadas ao controle ( $p < 0,02$ ) (Fig. 27).

**Figura 27.** Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após a inoculação de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



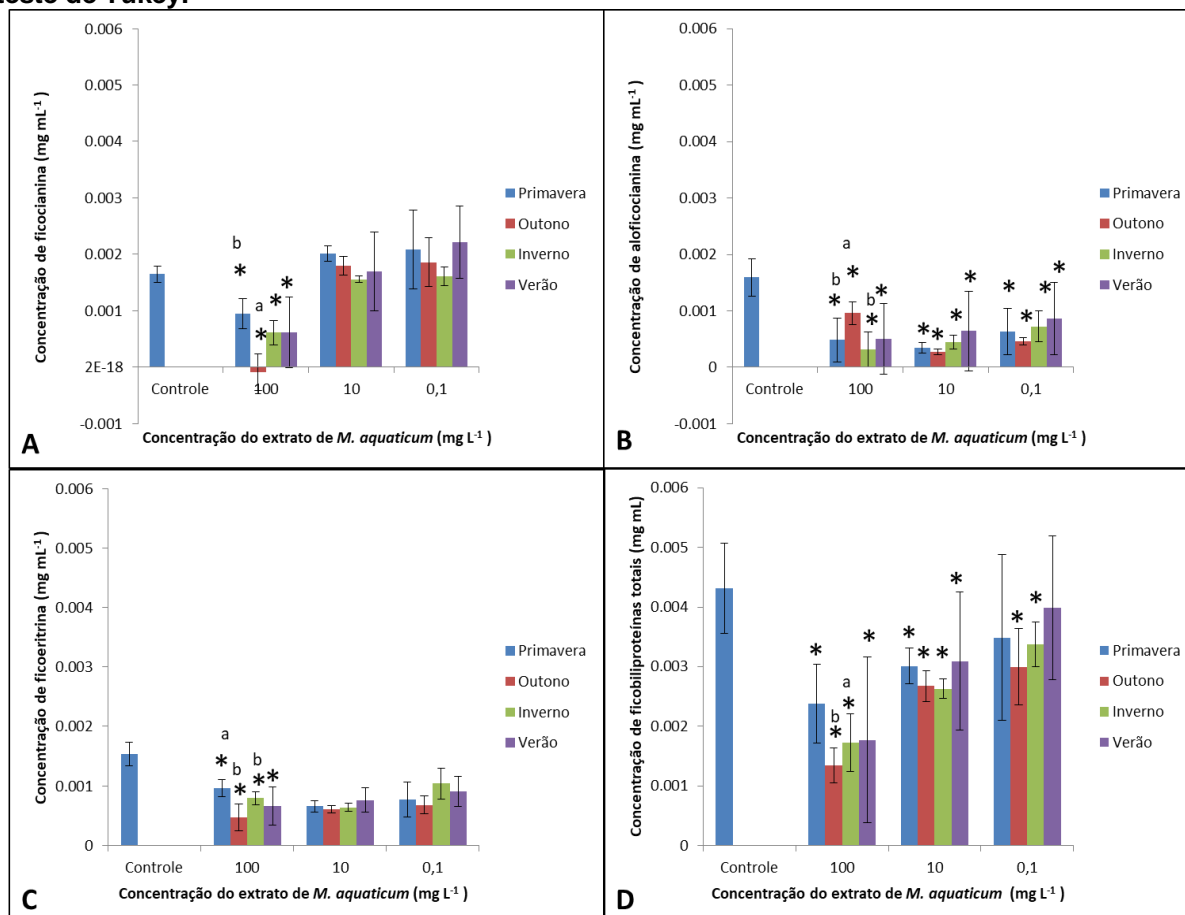
Fonte: autoria própria

Para a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> as estações outono e inverno, apresentaram maiores interferências na redução de concentração de clorofila-a, quando comparadas às outras estações, com diferenças significativas ( $p=0,0001$ ). Na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> não ocorreram diferenças significativas entre as estações. Para a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, a estação de outono e inverno apresentaram concentrações de clorofila-a inferiores às estações de primavera e verão ( $p < 0,0002$ ).

Em relação aos pigmentos acessórios, foi possível verificar a existência de efeitos relativos ao extrato hidroetanólico, para todas as estações, principalmente na

concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de extrato sobre todos os pigmentos analisados (Fig. 28).

**Figura 28.** Concentração de pigmentos acessórios de *Microcystisaeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum*, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição. A) Ficocina; B) aloficocianina; C) Ficoeritrina; D) Ficobiliproteínas totais (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as estações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

Foi verificado que apenas para a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> ocorreram reduções nas concentrações de ficocianina para todas as estações, quando comparados ao controle (p≤0,03). Entretanto, ao analisar as concentrações de 10 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> é possível verificar que há um aumento na concentração do pigmento, quando comparados ao controle.

Para aloficocianina, foram constatadas reduções significativas, para todas as estações nas três concentrações de extrato hidroetanólico aplicado (p<0,00002). Dentre as concentrações em estudo, foi verificado que apenas em 100 mg L<sup>-1</sup>

ocorreram diferenças significativas na redução do pigmento acessório, entre a estação de outono, quando comparadas à primavera e inverno ( $p=0,00001$ ) (Fig. 28B).

Em relação à concentração de ficoeritrina, verificou-se que para todas as estações e concentrações de extrato testado ocorreram reduções significativas, quando comparadas ao controle ( $p<0,00002$ ). Dentre as diferenças entre as estações, nota-se que as estações de outono e verão apresentaram reduções significativas, quando comparadas à estação de primavera ( $p<0,04$ ) (Fig. 28C).

Para ficobiliproteínas totais ocorreram reduções significativas para todas as estações e concentrações de extrato testado, quando comparados ao controle ( $p<0,00035$ ). Ao comparar os efeitos das estações, verifica-se que em outono, na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , ocorreu menores concentrações do pigmento, quando comparadas às outras estações, principalmente com inverno ( $p=0,00017$ ) (Fig. 28D).

Dentre os pigmentos analisados, constatou-se que ficocianina apresentou maior contribuição sobre a composição de ficobiliproteínas totais. Além disso, visto a interferência sobre todos os pigmentos acessórios e clorofila-a, pode-se observar que os extratos hidroetanólicos de *M. aquaticum* interferiram sobre o funcionamento dos fotossistemas I e II de *M. aeruginosa*, independente da estação em estudo.

#### 6.4.4 Efeitos na concentração de microcistina-LR

O extrato hidroetanólico apresentou efeitos sobre a produção de microcistina-LR total, após nove dias experimentais, para todas as estações estudadas, principalmente, para a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , com diferenças significativas, quando comparadas ao controle ( $p<0,0061$ ). Nota-se que os percentuais máximos de redução de microcistina-LR total entre as estações, variaram de 93,403 a 95,125% entre as estações para a maior concentração em estudo (Tab. 4).

Entretanto, ao analisar a concentração de microcistina-LR por célula, não foram verificadas diferenças significativas para nenhuma estação e concentração, quando comparadas ao controle. Dentre os resultados obtidos, foi possível constatar



o aumento na concentração de toxinas para todas as estações, principalmente nas maiores concentrações.

Possivelmente, o aumento na produção da cianotoxinas está relacionado com possíveis efeitos de estresses celulares de *M. aeruginosa*. Assim como Dziga et al. (2007) constataram aumento de cianotoxinas no meio, após a inoculação de hidroquinona isolado de macrófitas, a presente pesquisa demonstra que, dependendo da concentração aplicada dos compostos, ao invés de corroborar para a mitigação dos impactos causados por microcistina-LR, a substância pode aumentar ainda mais a liberação da cianotoxinas no meio, demandando atenção, principalmente para as concentrações a serem aplicadas no tratamento.

Alguns autores relacionam a maior produção de microcistinas pelas cianobactérias, com estímulos sobre genes precursores da produção das cianotoxinas, após o uso de aleloquímicos. Svanys et al., (2016) afirmam que após o uso de ácido tânico, ocorreu aumento na produção do genótipo de microcistinas, porém, citam que desconhecem tal motivo. Wang et al. (2016), após utilizarem pirogallol, perceberam o aumento da síntese dos genes *mcyB*, *mcyD* e *mtcA*, que são genes relacionados com a produção de microcistinas. Ni et al. (2015), ao utilizarem  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de ácido linoléico, observaram inibição de 95% de crescimento celular e redução de teores de clorofila-a de *M. aeruginosa*, porém, foi constatado maiores liberações de microcistina-LR no meio de cultivo. Tais afirmações nos inferem a demanda por atenção sobre as concentrações a serem utilizadas, bem como, o tipo de substância algicida a ser aplicada, para que mesmo após a inibição das células de *M. aeruginosa*, não ocorra a maior liberação de microcistinas no meio, visto à sua potencialidade tóxica.

Tabela 4. Concentração de microcistina-LR total de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3).

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de microcistina-LR total (µg L <sup>-1</sup> )				Redução de microcistina-LR total (%)			
	Primavera	Outono	Inverno	Verão	Primavera	Outono	Inverno	Verão
Controle	0,245 ± 0,09				-			
100	0,018 ± 0,008 *	0,018 ± 0,006 *	0,024 ± 0,000 *	0,020 ± 0,003 *	94,854	95,125	93,403	94,450
10	0,249 ± 0,006	0,219 ± 0,009	0,173 ± 0,073	0,185 ± 0,020	32,961	41,054	54,196	50,188
0,1	0,292 ± 0,119	0,298 ± 0,059	0,266 ± 0,067	0,280 ± 0,134	20,603	19,493	27,840	23,655

\*indica diferença significativa (p<0,05) entre as estações quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Concentração de microcistina-LR por célula de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico 80% de *Myriophyllum aquaticum* no último dia experimental, para a comparação dos efeitos sazonais de inibição (n=3).

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de microcistina-LR total (ng L <sup>-1</sup> )				Redução de microcistina-LR total (%)			
	Primavera	Outono	Inverno	Verão	Primavera	Outono	Inverno	Verão
Controle	31,584 ± 2,221				-			
100	36,375 ± 18,855	50,223 ± 25,849	65,820 ± 1,833	43,254 ± 11,048	3,584	↑58,74	↑71,11	↑13,67
10	46,361 ± 1,189	60,803 ± 3,996	32,604 ± 13,888	33,820 ± 4,095	↑20,69	↑57,88	16,515	12,271
0,1	33,145 ± 12,662	38,350 ± 7,000	33,966 ± 8,080	34,987 ± 16,619	12,367	↑0,33	10,837	72,988

\*indica diferença significativa (p<0,05) entre as estações quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ↑indica aumento da concentração de microcistina-LR

## 6.5 Efeitos das frações do extrato hidroetanólico sobre *M. aeruginosa*

### 6.5.1 Efeitos no crescimento e viabilidade celular de *M. aeruginosa*

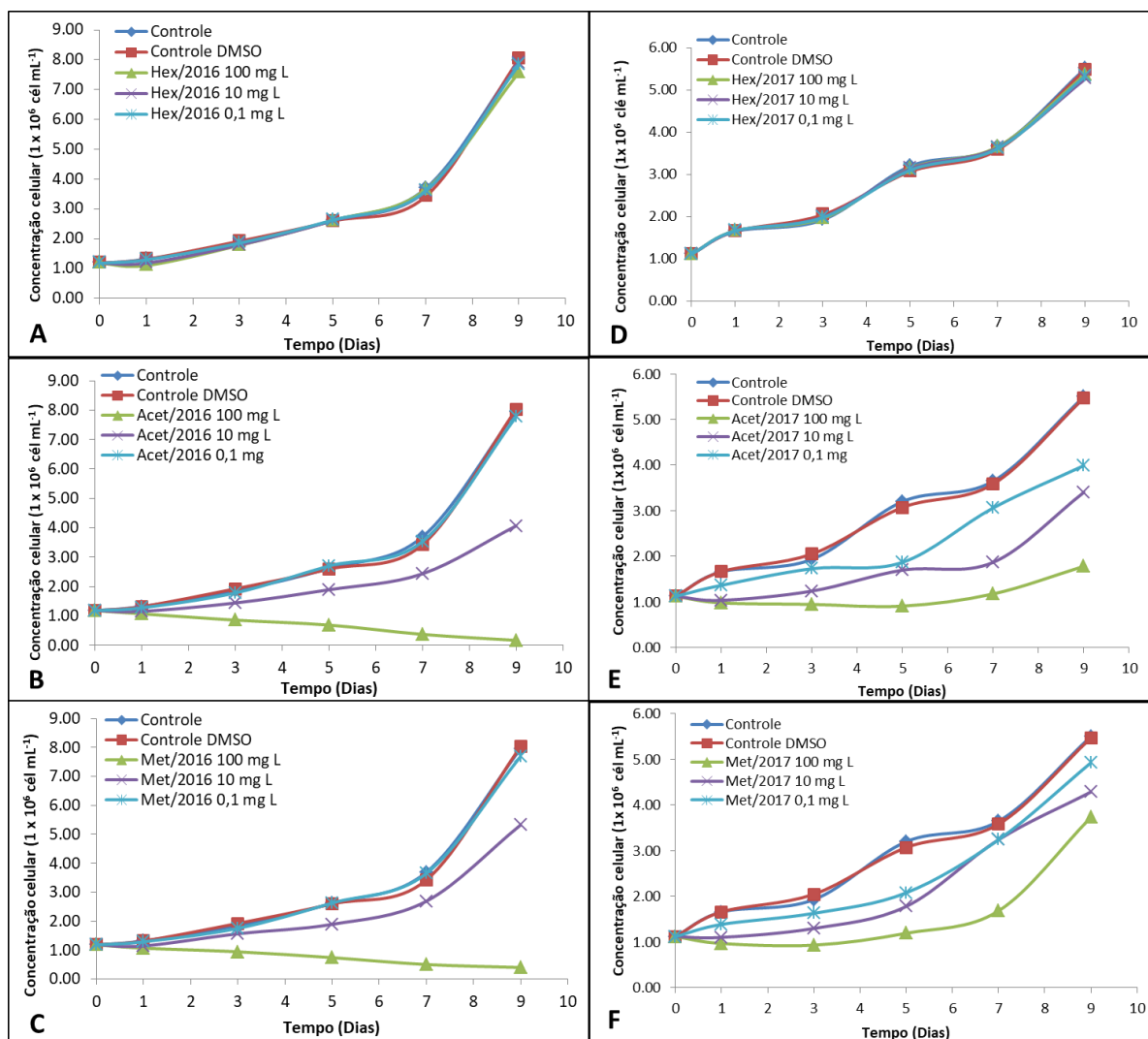
De modo a verificar se existiriam diferenças entre os efeitos de grupos de compostos presentes no extrato hidroetanólico de *M. aquaticum* sobre *M. aeruginosa*, foi realizado o fracionamento de extratos provenientes da estação de outono de 2016 e 2017, conforme procedimento descrito no item 5.5. As frações foram obtidas com solventes de diferentes polaridades {hexano (hex), acetato de etila (acet) e metanol (met)}, estratégia adotada tradicionalmente em estudos fitoquímicos de bioprospecção de atividade biológica de plantas medicinais (SIMÕES, 2010).

Em relação aos efeitos das frações dos extratos hidroetanólicos (2016 e 2017), foi verificado efeito sobre o crescimento de *M. aeruginosa* para as frações acetato de etila e metanol, nas concentrações de 100 e 10 mg L<sup>-1</sup> com diferenças significativas, quando comparados ao Controle ( $p < 0,0005$ ). A fração hexano não apresentou efeito inibitório em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 29).

No período de out/2016, constatou-se que acet/2016 apresentou maiores efeitos, do que a met/2016, principalmente na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 29A), porém, não ocorreu diferença significativa quando as mesmas foram comparadas. Ainda para as amostras de outono/2017, acet/2017 apresentou efeitos mais significativos quando comparada a met/2017 na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> ( $p = 0,0002$ ). Dentre os dois períodos estudados, constatou-se que no ano de 2016, as frações acetato de etila e metanol demonstraram maiores bioatividades sobre o crescimento, impedindo o crescimento de *M. aeruginosa* durante todo o período experimental.

Não foi verificada diferença significativa entre o tratamento Controle com o Controle DMSO em ambos os períodos, o que demonstra que a atividade sobre o crescimento de *M. aeruginosa*, foi pelo efeito dos extratos, sem interferência do DMSO.

Figura 29. Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* após o uso de diferentes concentrações das frações obtidas do extrato hidroetanólico dos períodos de outono/2016 (A-C) e outono/2017 (D-F): Fração Hexano (A,D); Fração acetato de etila (B,E); Fração metanol. (n=3).

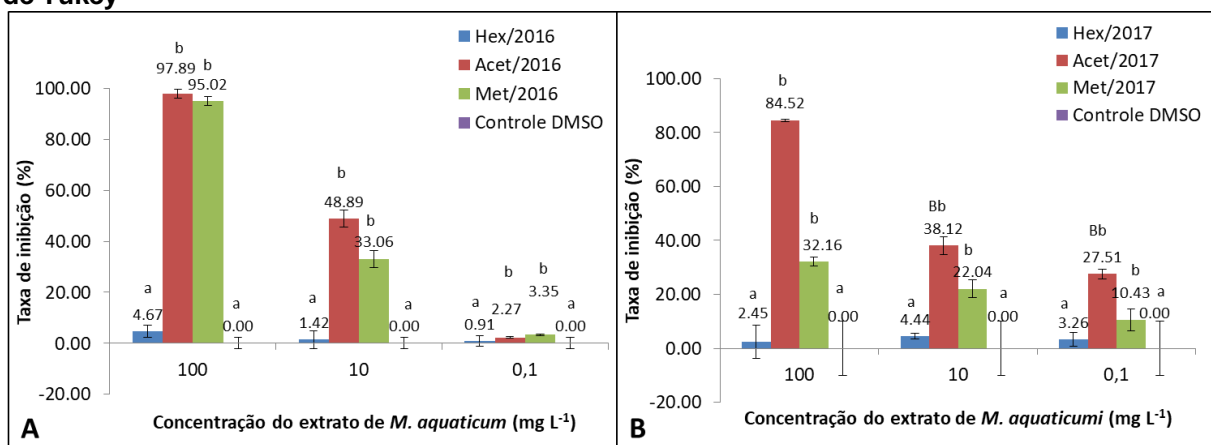


Fonte: autoria própria

Referente às taxas de inibição de *M. aeruginosa* após o uso das diferentes frações, constatou-se apenas efetividade de acetato de etila (acet) e metanol (met) para ambos os períodos (Fig. 30).

Foi constatado que hex/2016 não apresentou inibições significativas, sendo observados valores próximos ou iguais a 0%. Já acet/2016 apresentou taxas de inibições mínimas e máximas de 2,27 a 97,89%. Para met/2016, foram verificadas inibições que variaram de 3,35 a 95,02% (Fig. 30A).

Figura 30. Taxa de inibição de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 (A) e outono/2017 (B) para o último dia experimental (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Anova, seguido pelo teste de Tukey



Fonte: autoria própria

Foi verificado que hex/2017 apresentou inibições de 0,9 a 4,66%. Para acet/2017, constataram-se inibições entre 27,50 a 84,52%. Já met/2017 apresentou inibições correspondentes a valores entre 10,54 a 32,04% (Fig 30B).

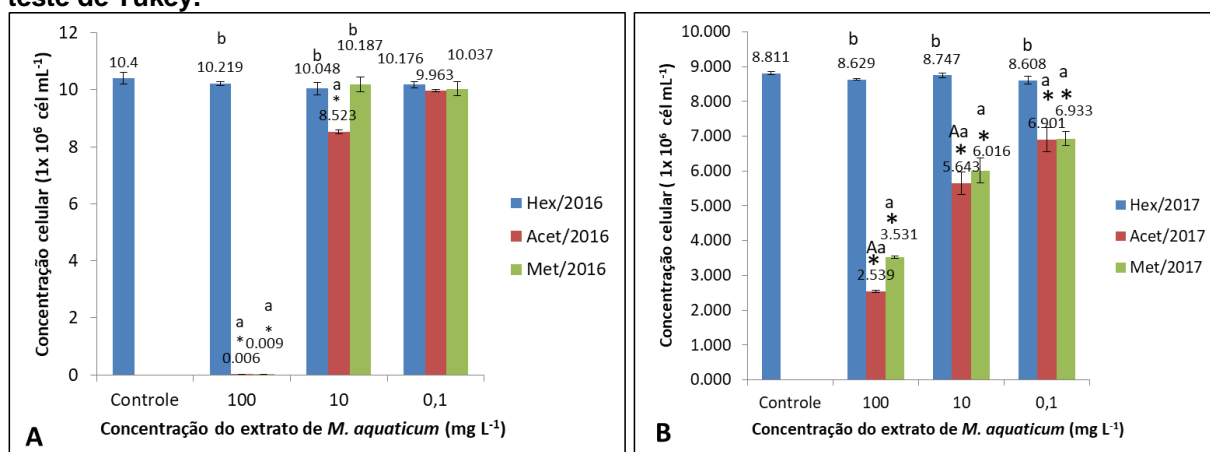
Dentre todas as frações estudadas, foi verificado que acetato de etila apresentou maiores percentuais de inibição para ambos os períodos. Entretanto, nota-se que há variações entre um ano para o outro, sendo possível constatar melhores taxas de inibição para o período de outono/2016, para as concentrações de 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, é possível verificar que o perfil inibitório foi mantido, independente do período analisado, sendo a fração acetato de etila a mais bioativa

Saito et al. (1989), ao realizarem o fracionamento líquido/líquido de *Myriophyllum brasiliense*, sinônimo científica de *M. aquaticum*, obtiveram como resultados que a fração acetato de etila, também apresentou maiores efeitos inibitórios, sobre *M. aeruginosa*, enquanto que a fração hexano quase não apresentou efeitos específicos sobre a cianobactéria. Tais informações corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa, principalmente por demonstrar a bioatividade da fração acetato de etila.

Após os experimentos de inibições com as frações, foram feitas a reinoculação de *M. aeruginosa* para verificar a viabilidade celular. Constatou-se que para ambos os períodos, foram obtidos interferências na viabilidade celular, principalmente para outono/2016, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 29A) para as

frações acetato de etila e metanol ( $p=0,0002$ ), quando comparadas ao controle. Ainda, foi constatada diferença significativa com menores concentrações celulares para a fração acetato de etila quando comparada ao metanol ( $p=0,0002$ ) na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Deste modo, o que pode-se observar é a inativação de células para a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  acet/2016 e met/2016, visto o crescimento inferior, quando comparadas às outras concentrações.

**Figura 29. Concentração celular de *Microcystis aeruginosa* após 10 dias para verificação da viabilidade celular após a aplicação de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 (A) e outono/2017 (B) ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.**



Fonte: autoria própria

Já para o período de outono/2017, verificou-se que houve diferença significativa para todas as concentrações das frações acetato de etila e metanol ( $p=0,0002$ ), quando comparadas ao controle. Ainda, foram verificadas menores concentrações celulares da fração acetato de etila quando comparada ao metanol, ocorrendo diferenças significativas para as concentrações de 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $p<0,0004$ ) (Fig. 29B).

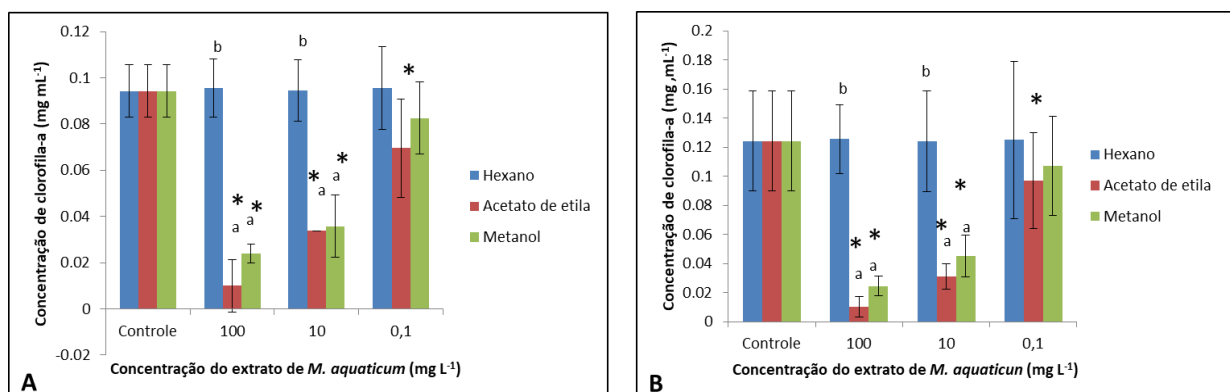
Tais resultados demonstram que as frações acetato de etila apresentaram efeitos algistáticos, visto que ocorreu crescimento celular de *M. aeruginosa*, mesmo após a aplicação das frações em experimentos de inibição. Além disso, verificou-se que para a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , principalmente, ocorreram maiores efeitos inibitórios de crescimento, obtendo relações com os percentuais de inibição demonstrados anteriormente.

### 6.5.2 Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos

Para os efeitos sobre a produção de clorofila-a, foi verificado que das três frações testadas, apenas acetato de etila e metanol apresentaram atividade sobre *M. aeruginosa*, quando comparados ao controle para os dois períodos testados, enquanto que a fração hexano não apresentou efeitos (Fig. 30).

Para ambos os períodos, foram verificados efeitos similares sobre a produção de clorofila-a. A fração acetato de etila, apresentou efeitos significativos ( $p < 0,008$ ) para todas as concentrações utilizadas, quando comparados ao controle. Para a fração metanol, também foi constatada diferença significativa, quando comparados ao controle ( $p \leq 0,00016$ ), exceto para a concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 30). Já quando foi feita a comparação entre as duas frações que obtiveram atividade, verifica-se que acetato de etila não apresentou diferenças significativas com metanol, mesmo sendo, as concentrações de clorofila-a, inferiores. (Fig. 30)

**Figura 30.** Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 (A) e outono/2017 (B) para o último dia experimental ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

Referente aos pigmentos acessórios foi verificado que as frações acetato de etila e metanol demonstraram reduções significativas, quando comparadas ao controle, tanto para 2016 quanto para 2017.

Para o período de outono/2016, foram constatados efeitos principalmente sobre os pigmentos ficocianina, ficoeritrina e ficobiliproteínas totais para as frações acetato de etila e metanol. (Fig. 31).

Ao analisar os efeitos sobre ficocianina, verificou-se que ocorreram diferenças significativas para acet/2016 ( $p=0,00018$ ) e met/2016 ( $p=0,0002$ ) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , quando comparadas ao controle. Dentre as frações, nota-se que a fração hexano apresentou diferenças significativas com as frações acetato de etila ( $p=0,02$ ) e metanol ( $p=0,0016$ ) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , visto que tal fração não obteve reduções da concentração de ficocianina (Fig. 31A).

Para aloficocianina, não foram constatados efeitos significativos para nenhuma fração, quando comparados ao controle. Porém, verificaram-se diferenças significativas entre hex/2016, quando comparadas à acet/2016 ( $p<0,00015$ ) e met/2016 ( $p<0,00016$ ), para todas as concentrações em estudo (Fig. 31B).

Foram observados reduções significativas para a concentração de ficoeritrina em acet/2016 ( $p=0,00016$ ) e met/2016 ( $p=0,0023$ ), quando comparados ao controle, na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Ao comparar as frações, constatou-se que houve diferenças significativas acet/2016 ( $p<0,0009$ ) e met/2016 ( $p<0,0009$ ), quando comparadas a hex/2016 para as concentrações de 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 31C).

Referente à concentração de ficobiliproteínas, foram constatadas reduções significativas para acet/2016 ( $p<0,026$ ) e met/2016 ( $p<0,027$ ), quando comparadas ao controle para todas as concentrações-teste em estudo. Já hex/2016 apresentou diferenças significativas quando comparada a acet/2016 ( $p<0,00016$ ) e met/2016 ( $p<0,00018$ ) (Fig 31D).

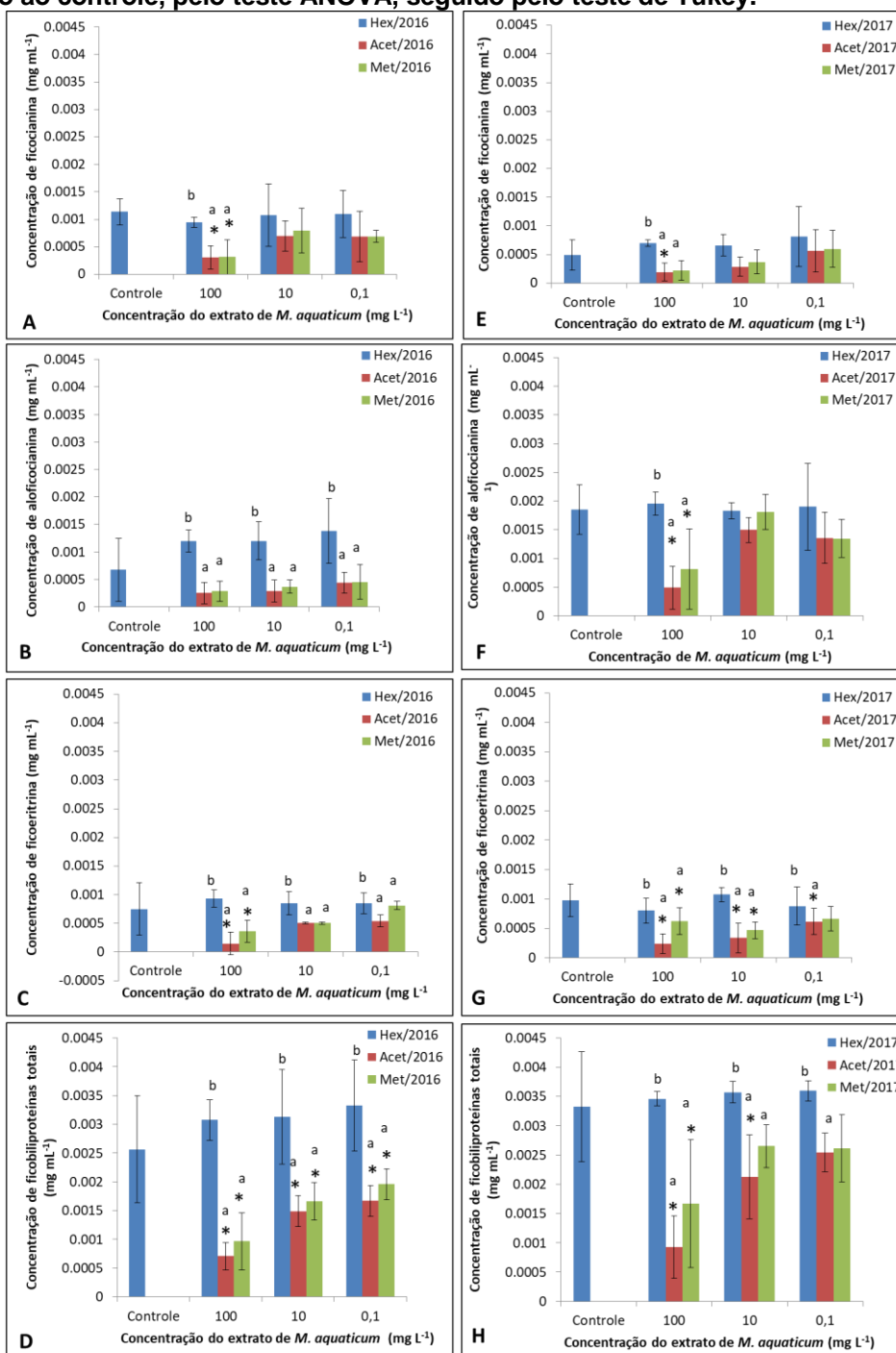
Dentre todas as frações testadas, é possível constatar que a fração acetato de etila apresentou maiores efeitos na redução dos pigmentos acessórios de *M. aeruginosa*, bem como a fração metanol. Verifica-se que a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou maiores efeitos significativos para ambas as frações, o que indica maiores potencialidades de bioatividade para esta concentração. Além disso, é possível observar efeitos diretos sobre o pigmentos que compõe o ficobilissomo, interferindo na atividade do fotossistema II de *M. aeruginosa*, bem como, a redução de clorofila-a pode estar relacionada com a menor atividade no fotossistema I das células.

Constatou-se ainda que, os pigmentos ficocianina e ficoeritrina foram os pigmentos que apresentaram relação direta com a inibição, visto que ambos



apresentaram redução de suas concentrações, quando foram obtidos maiores atividades inibitórias.

**Figura 31. Concentração de pigmentos acessórios de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* provenientes dos períodos de outono/2016 e outono/2017 para o último dia experimental. A) Ficocianina; B) Aloficocianina; C) Ficoeritrina; D) Ficobiliproteínas totais (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.**



Fonte: autoria própria

Para o período de outono/2017 foram observados efeitos das frações do extrato de *M. aquaticum* sobre os pigmentos acessórios de *M. aeruginosa*, principalmente para ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina e ficobiliproteínas totais, quando comparados ao controle (Fig. 31 E-H).

Foram obtidas menores concentrações de ficocianina, para a fração acet/2017, quando comparados ao controle ( $p=0,0016$ ) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Ao comparar as frações, foi observada diferença significativa entre hex/2017 com as frações acet/2017 ( $p=0,0013$ ) e met/2017 ( $p=0,03$ ).

Para aloficocianina, foram constatadas diferenças significativas, quando comparadas ao controle, as frações acet/2017 ( $p=0,00016$ ) e met/2017 ( $p=0,0092$ ) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Ao realizar a comparação entre as frações, foi possível observar diferença entre hex/2017 e as frações acet/2017 ( $p=0,00016$ ) e met/2017 ( $p=0,003$ ).

Referente à concentração de ficoeritrina (Fig. 33G), foram verificadas diferenças significativas para as frações acet/2017 e met/2017, quando comparadas ao controle, nas concentrações de 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . A fração acetato de etila apresentou diferenças significativas com o controle nas concentrações de 0,1 ( $p=0,00016$ ), 10 ( $p=0,00016$ ) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $p=0,025$ ), enquanto a fração metanol obteve reduções significativas para as concentrações 10 ( $p=0,045$ ) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $p=0,0039$ ).

Para a concentração de ficobiliproteínas totais, foram constatadas reduções significativas para as frações acetato de etila ( $p<0,0074$ ) e metanol ( $p=0,0002$ ), quando comparadas ao controle, principalmente para a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Ambos os períodos apresentaram maiores reduções das concentrações dos pigmentos fotossintéticos para as frações acetato de etila e metanol, porém, nota-se que em outono/2016 foram constatados maiores efeitos significativos para as concentrações 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que para outono/2017, mais efetiva foi  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Diante de tais resultados, é possível verificar que a concentração de ficocianina, ficoeritrina e ficobiliproteínas totais, juntamente com a redução de clorofila-a demonstraram relação direta com as taxas de inibição celular obtida na presente pesquisa, demonstrando que essas duas frações podem apresentar bioatividade sobre o potencial fotossintético de *M. aeruginosa*.

### 6.5.3 Efeitos das frações sobre a concentração de microcistina-LR

Foi constatado que apenas a fração acet/2016 apresentou diferenças significativas na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  quando comparadas ao controle, sobre a concentração de microcistina-LR total ( $p=0,04$ ). Dentre os percentuais de redução obtidos, as frações hex/2016, acet/2016 e met/2016 apresentaram 10,248; 86,229 e 41,141%, respectivamente (Tab.6).

**Tabela 6. Concentração de microcistina-LR total de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* do período de outono/2016, no último dia experimental (n=3).**

Tratamentos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração de microcistina-LR total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Redução de microcistina-LR total (%)		
	Hex/2016	Acet/2016	Met/2016	Hex/2016	Acet/2016	Met/2016
Controle		0,448 $\pm$ 0,161			-	
100	0,283 $\pm$ 0,100	0,058 $\pm$ 0,005*	0,217 $\pm$ 0,138	10,248 <sup>b</sup>	86,229 <sup>a</sup>	41,141 <sup>a</sup>
10	0,378 $\pm$ 0,159	0,477 $\pm$ 0,126	0,488 $\pm$ 0,219	5,048	↑18,978	↑6,824
0,1	0,471 $\pm$ 0,164	0,482 $\pm$ 0,322	0,480 $\pm$ 0,268	↑20,179	↑0,325	↑24,490

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ↑

Para o período de 2017, foi observado que ocorreu diferença significativa entre o controle e a fração acet/2017 na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $p=0,03$ ). Ainda, esta mesma fração foi a única que apresentou redução no percentual de microcistina-LR total para as concentrações de 100 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , com as taxas de 46,516 e 13,858, respectivamente.

**Tabela 7. Concentração de microcistina-LR total de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* do período de outono/2017, no último dia experimental (n=3).**

Tratamentos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração de microcistina-LR total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Redução de microcistina-LR total (%)		
	Hex/2017	Acet/2017	Met/2017	Hex/2017	Acet/2017	Met/2017
Controle		0,330 $\pm$ 0,096			-	
100	0,416 $\pm$ 0,119	0,196 $\pm$ 0,061*	0,552 $\pm$ 0,211	↑17,555 <sup>b</sup>	46,516 <sup>a</sup>	↑10,83 <sup>b</sup>
10	0,510 $\pm$ 0,195	0,307 $\pm$ 0,061	0,431 $\pm$ 0,191	↑45,547	13,858	↑59,670
0,1	0,444 $\pm$ 0,223	0,406 $\pm$ 0,111	0,469 $\pm$ 0,203	↑26,339	↑14,374	↑34,533

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. ↑ indica aumento da concentração de microcistina-LR

Ao analisar a concentração de microcistina-LR por célula para o período de 2016, foi verificado aumento significativo para todas as concentrações das frações acet/2016 e met/2016 ( $p \leq 0,05$ ). Apenas a fração Hex/2016 apresentou percentual de redução da cianotoxinas na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , com 10,98%. Para o fracionamento de 2017, foi verificado o mesmo efeito de aumento de concentração das cianotoxinas para todas as frações, não ocorrendo redução da concentração de microcistina-LR por célula.

**Tabela 8. Concentração de microcistina-LR por célula de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* do período de outono/2016, no último dia experimental (n=3).**

Tratamentos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração de microcistina-LR por célula total ( $\text{ng L}^{-1}$ )			Redução de microcistina-LR por célula (%)		
	Hex/2016	Acet/2016	Met/2016	Hex/2016	Acet/2016	Met/2016
Controle	44,028 $\pm$ 1,543			-		
100	37,38 $\pm$ 13,29	364,10 $\pm$ 82,6 *	549,30 $\pm$ 351,11*	10,98	$\uparrow$ 58,161	$\uparrow$ 10,830
10	48,02 $\pm$ 20,03	116,92 $\pm$ 25,64	90,83 $\pm$ 37,01	$\uparrow$ 8,137	$\uparrow$ 12,839	$\uparrow$ 59,670
0,1	53,04 $\pm$ 20,25	61,52 $\pm$ 40,54	62,77 $\pm$ 36,23	$\uparrow$ 20,850	$\uparrow$ 2,316	$\uparrow$ 28,530

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

**Tabela 9. Concentração de microcistina-LR por célula de *Microcystis aeruginosa* após a adição de diferentes concentrações de frações do extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* do período de outono/2017, no último dia experimental (n=3).**

Tratamentos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração de microcistina-LR por célula total ( $\text{ng L}^{-1}$ )			Redução de microcistina-LR por célula (%)		
	Hex/2017	Acet/2017	Met/2017	Hex/2017	Acet/2017	Met/2017
Controle	59,885 $\pm$ 16,19			-		
100	77,99 $\pm$ 24,46	127,22 $\pm$ 12,11 *	147,57 $\pm$ 55,87 *	$\uparrow$ 20,406	$\uparrow$ 64,457	$\uparrow$ 12,905
10	97,40 $\pm$ 38,64	90,13 $\pm$ 16,20	101,08 $\pm$ 48,36	$\uparrow$ 52,007	$\uparrow$ 38,387	$\uparrow$ 49,185
0,1	83,30 $\pm$ 40,96	101,71 $\pm$ 26,79	94,46 $\pm$ 38,98	$\uparrow$ 29,418	$\uparrow$ 56,966	$\uparrow$ 48,081

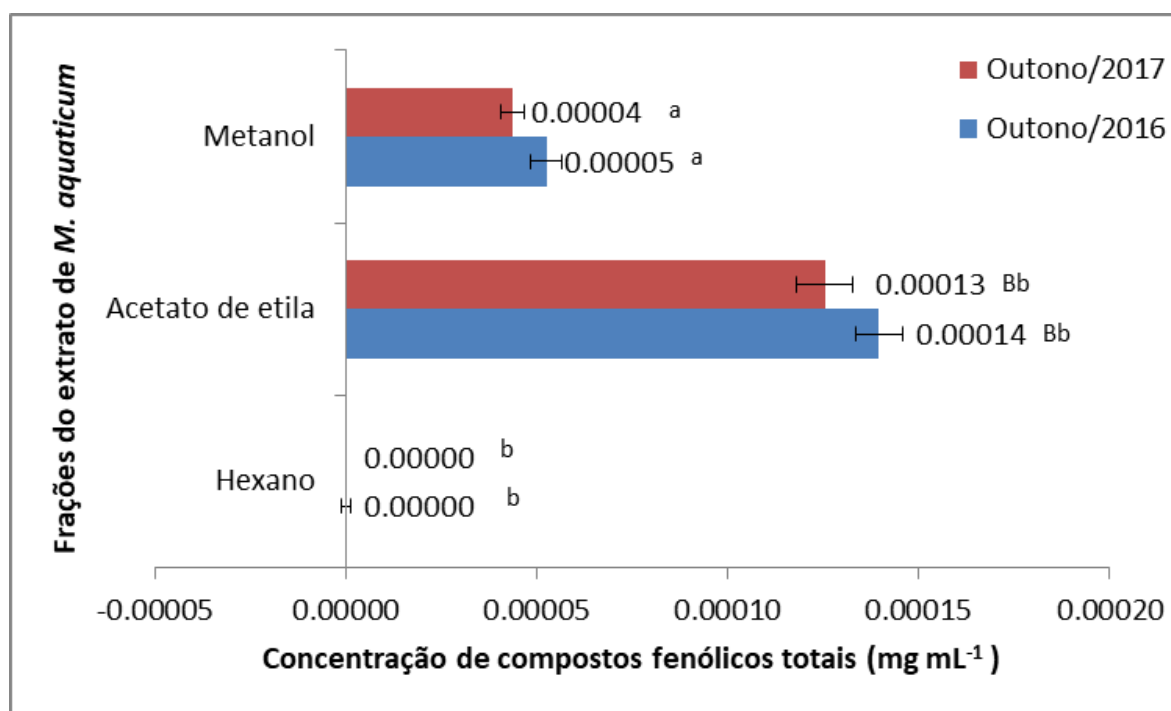
Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frações e \* indica diferença quando comparado ao controle, pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

Diante dos resultados obtidos, verifica-se a necessidade de atenção para as frações a serem utilizadas. Nota-se que, a fração acetato de etila, apresentou melhores efeitos e percentuais de redução de microcistina-LR total, porém quando verificadas as concentrações da cianotoxina por célula, constatou-se um aumento da concentração, bem como a fração metanol, também apresentou tal comportamento. Demanda-se atenção visto que, apesar de elevadas inibições celulares para as frações em estudo, há maior estímulo de produção de toxina por unidade celular.

#### 6.5.4 Concentração de compostos fenólicos totais das frações do extrato hidroetanólico de *M. aquaticum*

Dentre as frações estudadas, foi constatado que as frações acetato de etila e metanol apresentaram compostos fenólicos em sua composição, enquanto que a fração hexano não apresentou para nenhum dos períodos em estudo (Fig. 32). Constataram-se diferenças significativas entre as frações. Ainda, foi observado que a fração acetato de etila apresenta maiores teores de compostos fenólicos, quando comparados ao metanol ( $p < 0,00016$ ). Não houve diferenças significativas entre os dois períodos estudados.

**Figura 32.** Concentração de compostos fenólicos totais ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das frações do extrato hidroetanólico (80% v/v) de *Myriophyllum aquaticum* dos períodos de outono/2016 e outono/2017 (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frações pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

Haroon e Abdel-Aal (2016) estudaram a composição química de *Myriophyllum spicatum* para verificar a atividade antialgal. Os autores realizaram o fracionamento utilizando cinco solventes: éter de petróleo (baixa polaridade) diclorometano, clorofórmio (média polaridade, assim como o acetato de etila), acetona e metanol. Dentre os grupos de compostos encontrados, estavam: alcaloides, cetonas, terpenos, fenólicos, ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos, esteróis e outros. A

fração que demonstrou maiores atividades foi a clorofórmio, que, dentre os compostos extraídos, foram encontrados quatro compostos fenólicos (2-Metóxi-4-vinilfenol, 3-(1,1-dimetiletil)-4-metóxfenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol, 2,20-metilenebis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol) aos quais foram atribuídos a bioatividade antialgal.

Conforme Simões et al. (2010), as análises com o reagente de Folin-Cicalteau tem maior detecção de flavonoides e, comentam que o solvente acetato de etila tem potencial de extrair flavonoides (em geral), cumarinas, enquanto que o metanol pode extrair heterosídeos. Baseado em tais afirmações, é possível constatar que solventes que extraem compostos de média polaridade (com menor hidrossolubilidade) e alta polaridade (principalmente hidrossolúveis) apresentam maiores bioatividades.

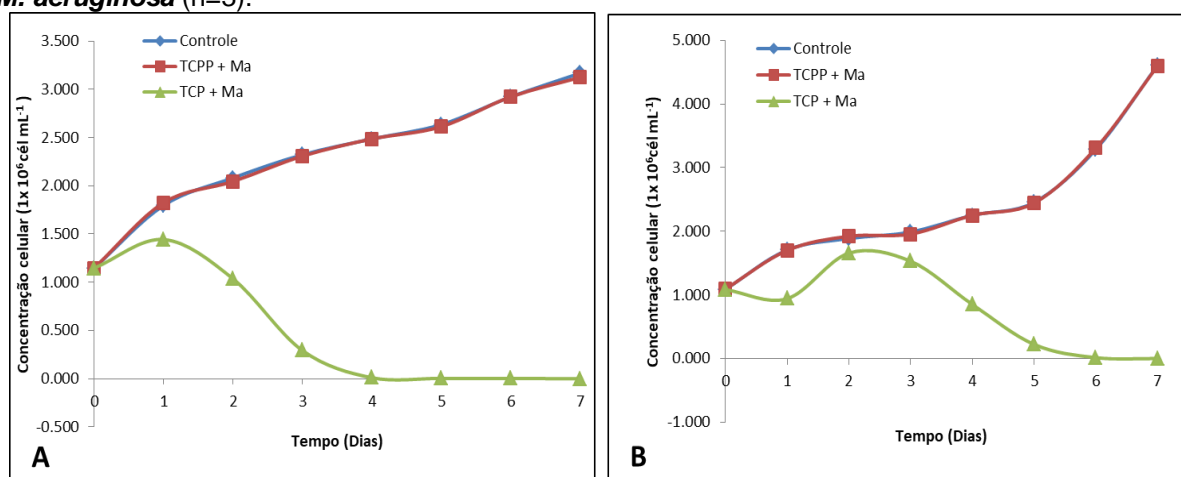
## 6.6 Atividade inibitória sobre *M. aeruginosa* em experimento de co-cultura utilizando *M. aquaticum*

### 6.6.1 Efeitos no crescimento celular *M. aeruginosa*

De modo a compreender os efeitos que as macrófitas vivas causariam sobre *M. aeruginosa*, o intuito da presente etapa foi analisar o potencial “*in vivo*” dos mecanismos alelopáticos de *M. aquaticum*.

Dentre os tratamentos estabelecidos, verificou-se que não houve diferença significativa entre o Controle e o uso da planta artificial (TCPA+Ma) para as plantas advindas do reservatório e cultivadas (TCP+Ma) em laboratório o que exclui a possibilidade da inibição ser atribuída a competição por espaço (Fig. 33)

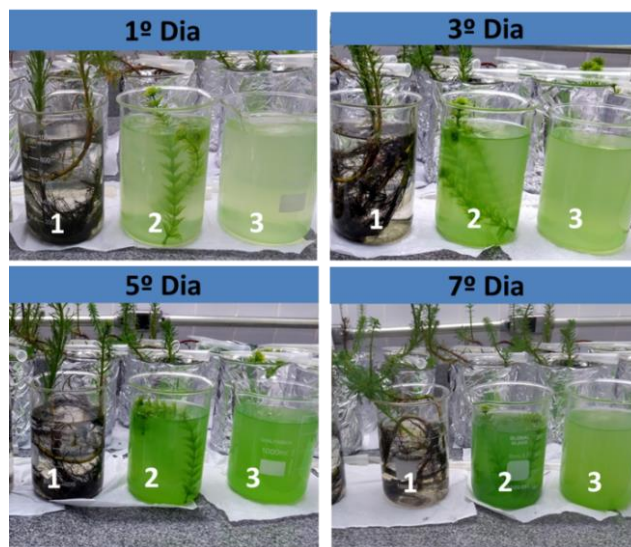
**Figura 33.** Efeitos sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* em experimento de co-cultura com *Myriophyllum aquaticum*. A) Plantas advindas do reservatório do rio Verde; B) Plantas adquiridas comercialmente. TCPA+Ma: Tratamento com plantas artificiais + cultivo de *M. aeruginosa* (n=3).



Fonte: autoria própria

Constatou-se que para o tratamento que foi utilizado *M. aquaticum* provenientes do reservatório do rio Verde, houve interferências significativas sobre o crescimento de *M. aeruginosa*, durante todo o período experimental (Fig.33A e 34).

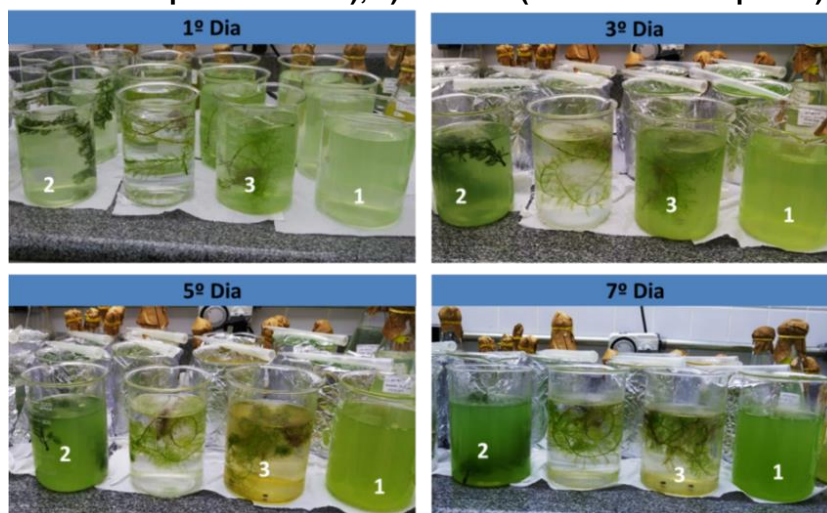
Figura 34. Representações dos dias experimentais dos experimentos de co-cultura com *M. aquaticum* proveniente do reservatório do rio Verde para inibições in vivo de *M. aeruginosa*: 1) TCP+ Ma (tratamento com planta); 2) TCPA+Ma (tratamento com planta artificial); 3) Controle.



Fonte: autoria própria

Para o tratamento em que foi utilizada *M. aquaticum* cultivadas, foi verificado que houve diferenças significativas, quando comparado ao controle para todos os dias experimentais ( $p < 0,0005$ ). Entretanto, constata-se que, ocorreram variações no crescimento, quando comparado ao experimento utilizando plantas advindas do reservatório do rio Verde. Dentre as alterações está o crescimento da cepa no segundo dia experimental. Apenas após o terceiro dia que foi verificado declínio celular e conseqüentemente sua inibição (Fig 33B e 35).

Figura 35. Representações dos dias experimentais dos experimentos de co-cultura com *M. aquaticum* adquiridas comercialmente para inibições in vivo de *M. aeruginosa*: 1) Controle; 2) TCPA+Ma (tratamento com planta artificial); 3) TCP+ Ma (tratamento com planta).

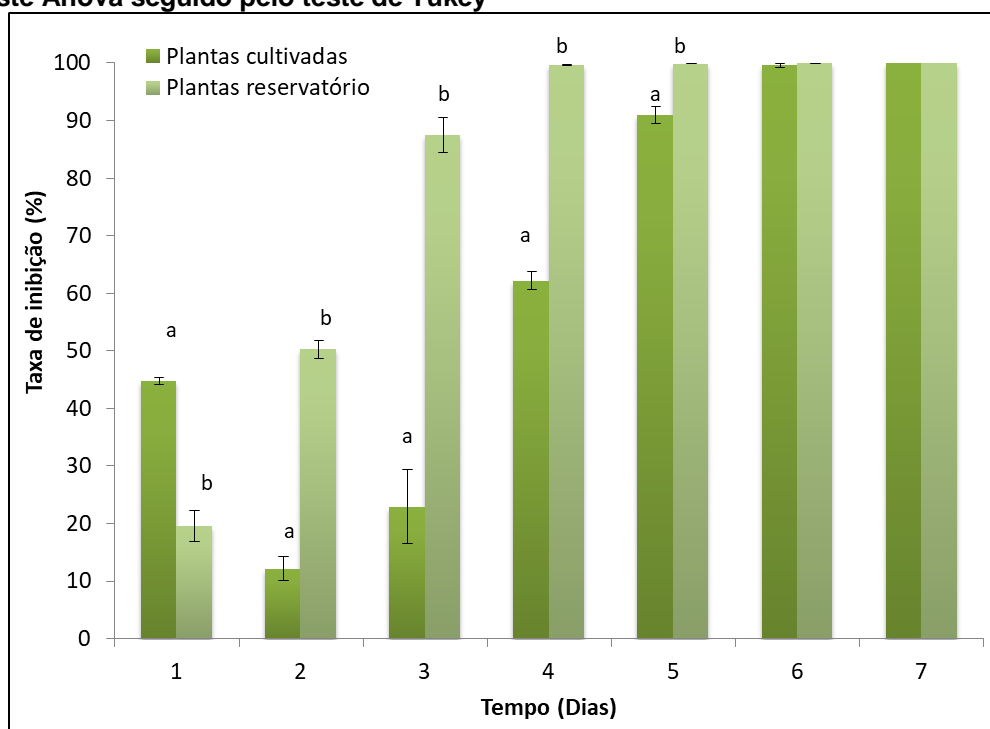


Fonte: autoria própria



Para os valores de inibição, as taxas obtidas chegaram a 100% de inibição no sétimo dia experimental, nos tratamentos com *M. aquaticum* independente da origem da planta (Fig.36).

**Figura 36. Taxas de inibição (%) de *Microcystis aeruginosa* em experimentos de co-cultura com *Myriophyllum aquaticum* (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey**



Fonte: autoria própria

Ao comparar os efeitos de inibição de *M. aquaticum* cultivadas e do ambiente natural, é possível verificar que ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos até o quinto dia experimental ( $p<0,00065$ ). Nota-se que as plantas advindas do reservatório do rio Verde apresentaram maiores percentuais de inibição desde o segundo dia experimental, quando comparadas às plantas adquiridas comercialmente.

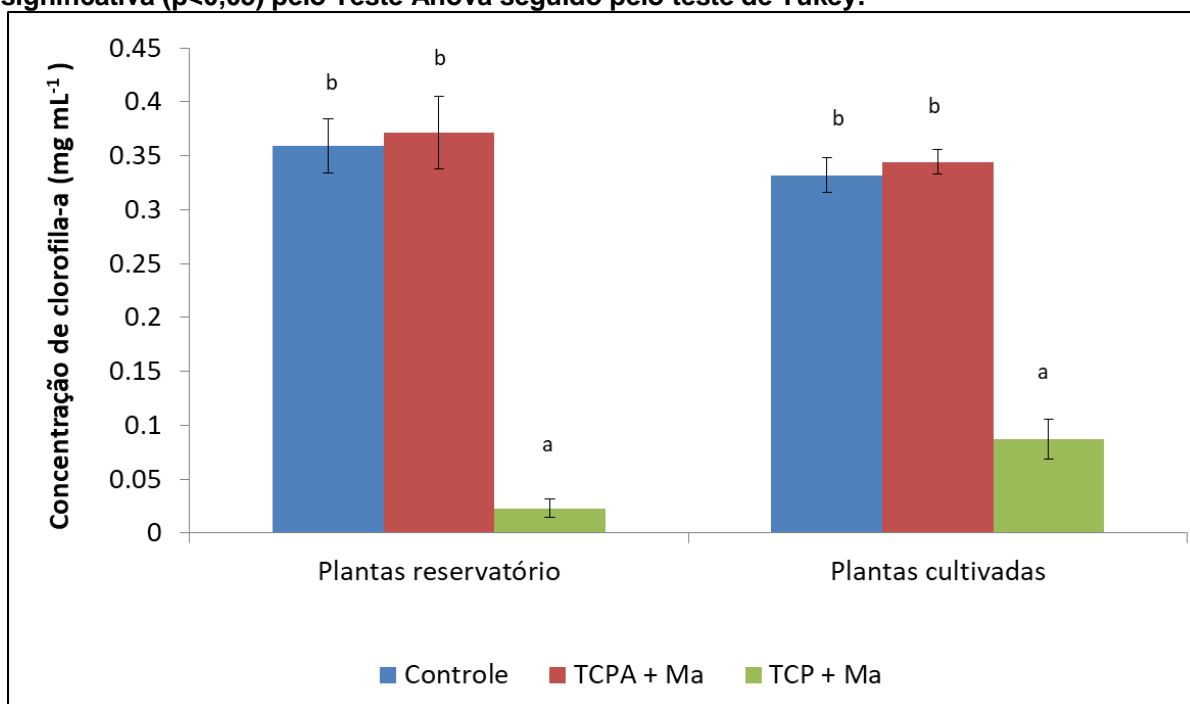
Conforme Cheng et al. (2008), após estudar o uso de meios de cultivo de *M. aquaticum* e dispor o mesmo, para verificar a inibição de *M. aeruginosa*, os autores constataram que a macrófitas pode secretar alguns aleloquímicos no meio e, conseqüentemente, inibir *M. aeruginosa*. O efeito da mistura entre os aleloquímicos liberados e, a liberação contínua dos mesmos corrobora para a inibição direta da cianobactéria.

Wang et al. (2017) obtiveram efeitos de inibição pela liberação de aleloquímicos de *M. aquaticum* em experimentos *in vivo* sobre as cepas de *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*. Como principal efeito observado, constatou-se a inibição da enzima superóxido dismutase, além da redução do teor de clorofila-a sendo estes, possíveis fatores atribuídos à morte das cianobactérias.

### 6.6.2 Efeitos sobre os pigmentos fotossintéticos

Foi verificado que *M. aquaticum* apresentou reduções significativas sobre a concentração de clorofila-a de *M. aeruginosa*, visto que tanto nos tratamentos utilizando as plantas do reservatório ( $p=0,00014$ ), quanto ao uso das plantas comerciais ( $p=0,00014$ ) foram obtidos menores concentrações, quando comparados ao controle e ao tratamento com plantas de plástico (Fig. 37).

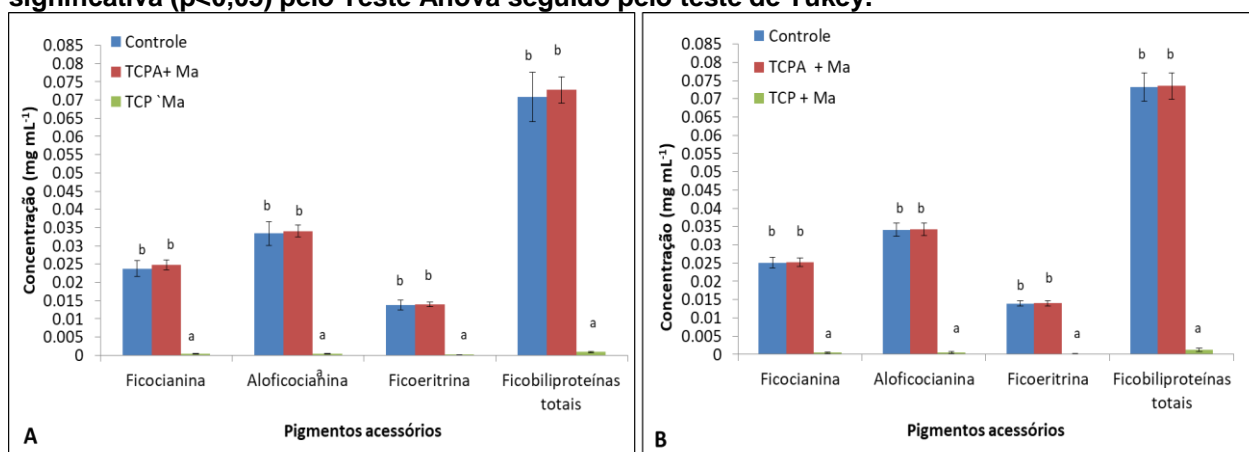
**Figura 37.** Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* após o uso de *Myriophyllum, aquaticum* em experimentos de co-cultura ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: autoria própria

Referentes aos pigmentos acessórios foram verificadas que as plantas adquiridas de ambiente natural e comercialmente apresentaram efeitos, quando comparados ao controle e ao tratamento com plantas de plástico (Fig. 38).

**Figura 38. Concentração de pigmentos acessórios de *Microcystis aeruginosa* após experimento de co-cultura com *M. aquaticum* (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.**



Fonte: autoria própria

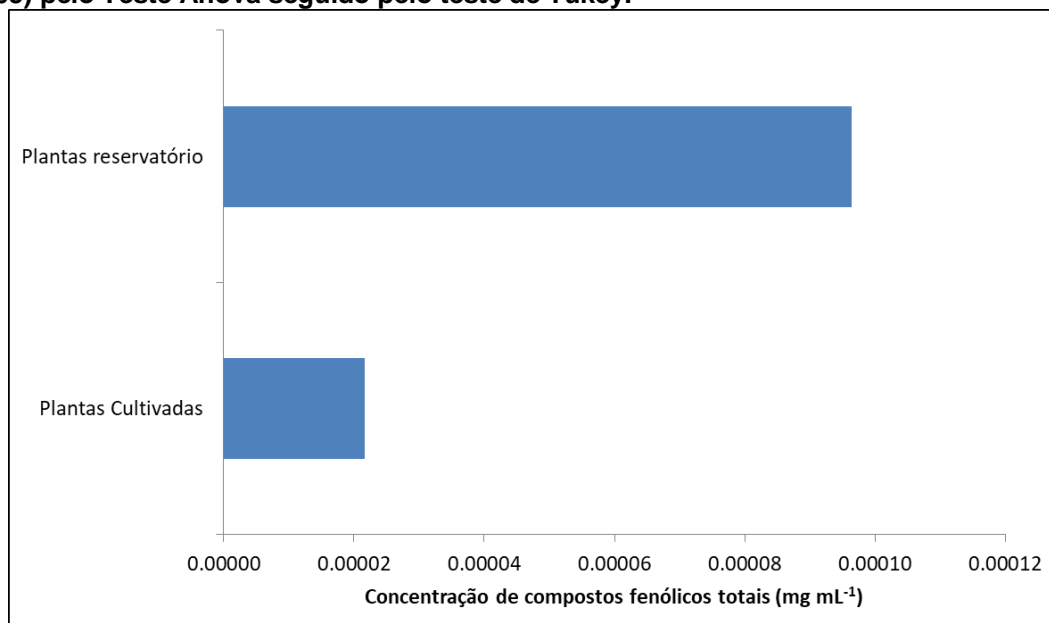
Em ambos os tratamentos, foi verificado que quando utilizada *M. aquaticum* para os testes, ocorreram reduções significativas para ficocianina ( $p < 0,0013$ ), aloficocianina ( $p < 0,0013$ ), ficoeritrina ( $p < 0,0013$ ) e na concentração de ficobiliproteínas totais ( $p < 0,0013$ ), quando comparados ao controle.

Diante dos resultados obtidos, é possível constatar que *M. aquaticum* apresenta efeitos sobre o potencial fotossintético de *M. aeruginosa*, visto que ocorreram reduções de clorofila-a e dos pigmentos acessórios, independente do local em que a macrófitas foi obtida.

### 6.6.3 Concentração de compostos fenólicos totais de *M. aquaticum*

Foram detectados compostos fenólicos totais em extratos hidroalcolóicos de plantas cultivada, quanto advindas de ambiente natural. Entretanto, é possível verificar que as plantas do ambiente natural apresentam maiores concentrações significativamente ( $p = 0,00035$ ) (Fig. 39).

**Figura 39. Concentração de compostos fenólicos totais ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de *Myriophyllum aquaticum* adquiridas comercialmente e do reservatório do rio Verde (n=3). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.**



**Fonte: autoria própria**

Tais resultados podem estar relacionados com os efeitos de inibições mais rápidas nas plantas advindas de ambiente natural, visto que a partir do segundo dia experimental, iniciou-se o declínio e morte da cianobactéria, enquanto que para as plantas adquiridas comercialmente apresentaram início da morte celular de *M. aeruginosa* a partir do terceiro dia experimental.

Espécies do gênero *Myriophyllum*, principalmente *M. spicatum* apresentam em sua composição fitoquímica diversos tipos de polifenóis hidrolisáveis, como tellimagrandin II, ácido pirogálico e ácido elágico que apresentam elevada atividade anti-cianobactérias (GROSS, 2003; GROSS, MEYER, SCHILLING, 1996; LU et al., 2017). Visto o potencial hidrossolúvel desses compostos, estima-se que a inibição *in vivo* potencialmente pode ocorrer devido a substâncias como essas que podem apresentar características bioativas, quando liberadas no ambiente aquático.

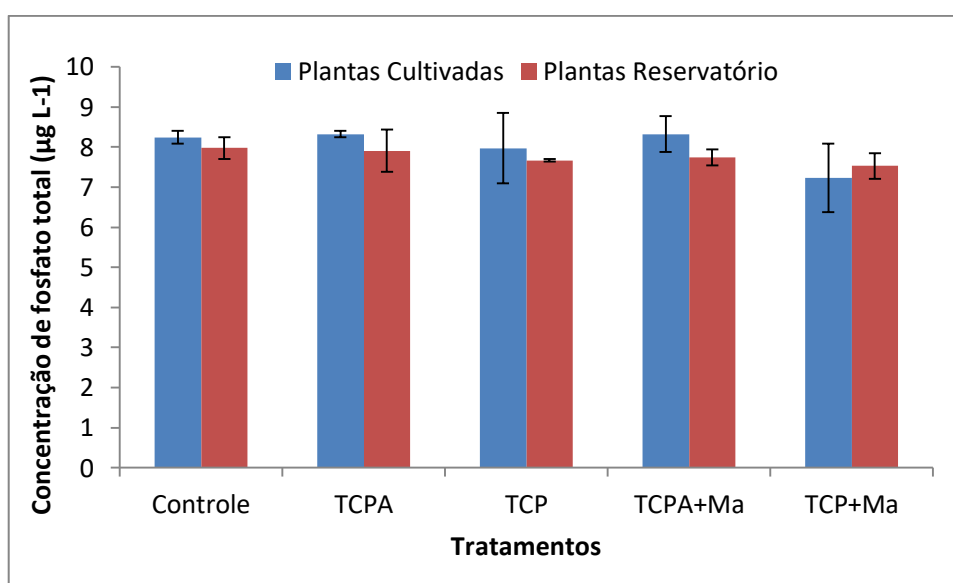
He et al. (2016), ao estudarem um sistema de co-cultura entre *Myriophyllum spicatum* e *M. aeruginosa*, constataram que a macrófita liberou continuamente compostos fenólicos, os quais aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio, induzindo a morte celular programada da cianobactéria. Tal fato ocorreu principalmente devido à liberação em baixas concentrações de compostos fenólicos. Essas informações permitem a corroboração das atividades biológicas observadas na presente pesquisa.

Deste modo, os resultados permitem demonstrar que *M. aquaticum* apresenta potencial alelopático sobre as cianobactérias, principalmente pela atividade que pode estar relacionada às concentrações e liberação de compostos fenólicos totais para o meio aquático.

#### 6.6.4 Comparação da concentração de fosfato total

A análise da concentração de fosfato total foi realizada principalmente para verificar se os efeitos inibitórios estariam relacionados com a competição por nutrientes. No entanto, foi constatado que não houve diferença significativa para as concentrações finais de fosfato entre nenhum dos tratamentos (Fig. 40).

**Figura 40. Concentração de fosfato total dos meios de cultura dos experimentos de co-cultura de *M. aquaticum* adquiridas do reservatório do rio Verde (A) e cultivadas (B) provenientes do último dia experimental (n=3).**



Fonte: autoria própria

Tais resultados permitem demonstrar que a inibição verificada da cianobactéria foi proveniente pela liberação de compostos pela planta viva, não sendo observados efeitos por competição por nutrientes e espaço.

Ferreira (2009), ao estudar o efeito alelopático de macrófitas submersas, incluindo *M. spicatum*, verificou que houve interferência sobre o potencial

fotossintético e redução da biomassa de *M. aeruginosa* após o tratamento utilizando a macrófita. Além disso, o autor identificou que o consumo de ortofosfato total por *M. spicatum* não foi significativo, quando comparado à cianobactéria, demonstrando, que o efeito inibitório ocorreu devido aos compostos liberados pela macrófita. Tais fatos corroboram com a presente pesquisa, visto que não foi observada diferença no consumo de fosfato total e, ainda assim foi constatado o potencial alelopático de *M. aquaticum*.

#### 6.6.5 Efeitos sobre a microcistina-LR

A macrófita *M. aquaticum* apresentou efeitos sobre a concentração de microcistina-LR total. Constatou-se que o tratamento com planta artificial (TCPA+Ma) não apresentou efeitos significativos, quando comparados ao controle. Já para o tratamento com planta (TCP+Ma), foi verificada redução significativa na concentração da cianotoxinas, quando comparado ao controle ( $p=0,00097$ ), com 78,99%. Já para a concentração de microcistina-LR por célula, foi verificada redução significativa de 99,904%, ao comparar TCP+Ma com o controle ( $p=0,00096$ ).

**Tabela 10. Concentração de microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* após experimentos utilizando *Myriophyllum aquaticum* em experimentos *in vivo* (n=3).**

	Microcistina-LR total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	% de redução	Microcistina-LR por célula ( $\text{ng L}^{-1}$ )	% de redução
<b>Controle</b>	$0,073 \pm 0,001^a$	-	$16,034 \pm 0,552^a$	-
<b>TCPA</b>	$0,071 \pm 0,01^a$	3,329 <sup>a</sup>	$15,541 \pm 2,808^a$	2,710 <sup>a</sup>
<b>TCP</b>	$0,015 \pm 0,011^b$	78,990 <sup>b</sup>	$0,015 \pm 0,011^b$	99,904 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) pelo Teste Anova seguido pelo teste de Tukey.

Nimpstsh et al. (2008), ao utilizarem um sistema de remoção com as macrófitas *Lemna minor*, *Myriophyllum elatinooides*, *Hydrilla verticillata*, e *Ceratopteris thalictroides* apresentaram eficiência maiores que 84% para microcistina-LR. Pflugmacher et al. (2015), ao estudarem um sistema para a remoção de cianotoxinas utilizando a combinação das macrófitas submersas vivas *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadenses* e *Myriophyllum spicatum*, apresentaram eficiência na redução de microcistinas (LR, RR e YR) de 67 a 85%. Os autores acreditam que as macrófitas apresentam um sistema de detoxificação e

realizam a biotransformação quando cianotoxinas são metabolizadas dentro dos vacúolos das células, permitindo a remoção das toxinas do ambiente.

Dentro da presente pesquisa, verificou-se efeito alelopático, principalmente sobre a inibição celular, sem que houvesse diferenças significativas entre nutrientes e espaço, demonstrando que a atividade observada não ocorreu por competição para esses fatores. Porém, esses estudos citados anteriormente demonstram que, além dos efeitos alelopáticos, processos de fitorremediação podem ocorrer para a redução de cianotoxinas, como microcistinas, o que torna ainda mais benéfico o uso de macrófitas aquáticas sobre o controle de cianobactérias e redução de cianotoxinas.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem inferir que *M. aquaticum* apresenta potencial alelopático frente à cianobactéria *M. aeruginosa*, devido à atividade inibitória sobre o crescimento celular, redução dos pigmentos fotossintéticos, viabilidade celular e redução na concentração de microcistina-LR.

Verificou-se que dentre as soluções extratoras testadas, tanto o extrato aquoso, quanto hidroetanólico apresentaram bioatividade sobre *M. aeruginosa*. Entretanto, devido às inibições observadas principalmente nas concentrações intermediárias, além dos percentuais de rendimento do extrato, e atividades sobre as cianotoxinas, o extrato hidroetanólico apresentou maior potencial para estudos.

Dentre as estações testadas, foi possível verificar que o período seco, principalmente para a estação de outono, foi verificado maior bioatividade dos extratos, visto as interferências fisiológicas em *M. aeruginosa*, além da relação da concentração de compostos fenólicos totais, com os resultados obtidos.

Referente ao fracionamento do extrato realizado, foi possível verificar que a fração acetato de etila deve ser melhor investigada, pois apresentou maiores resultados para a inibição de *M. aeruginosa*, o que pode estar relacionado com a maior presença de compostos bioativos, juntamente com a fração metanol. Além disso, constatou-se maiores reduções de microcistina-LR total para a fração acetato de etila, demonstrando ainda mais o seu potencial inibitório. Porém, demanda-se atenção quanto à fração e a concentração do extrato a ser escolhida para aplicação, visto que os percentuais de microcistina-LR por célula apresentaram elevação da concentração quando as frações foram aplicadas. Ainda, verificou-se que há variação interanual na bioatividade das frações, porém, o perfil inibitório e de atividades sobre a cianobactéria são mantidos.

Por fim, após os experimentos *in vivo* foi possível constatar que *M. aquaticum* apresenta potencial alelopático, visto que em um período de sete dias, foram constatadas 100% de inibição, redução dos teores de pigmentos fotossintéticos e redução de microcistina-LR. As análises com as plantas artificiais demonstraram que não ocorreu inibição por competição por espaço e, as análises de fosfato total, demonstraram que não ocorreram interferências na taxa de nutriente disponível, o que indica que as inibições não ocorreram por competição por nutrientes.



Para todos os experimentos realizados foi constatado que, dentre os efeitos principais que podem ser atribuídos à atividade inibitória de *M. aeruginosa*, são as reduções dos pigmentos fotossintéticos. E, verificou-se que diante dos resultados obtidos, os principais pigmentos afetados e que podem ser relacionados com a interferência sobre o potencial fotossintético são: clorofila-a, ficocianina e ficoeritrina.

Sugere-se maior atenção para as concentrações de extratos a serem utilizadas, pois, apesar das inibições celulares e redução da concentração dos pigmentos fotossintéticos, pode ocorrer um aumento na produção de cianotoxinas por célula.

Diante de tais resultados, é possível concluir que *M. aquaticum* apresenta atividade inibitória por mecanismos alelopáticos, frente às cianobactérias e que ainda, há a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre os compostos bioativos para possíveis relações com fatores de inibição.

## 9 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros, poderão ser feitos fracionamentos dos extratos de *M. aquaticum* com diferentes solventes, além dos testados para que sejam separadas substâncias com polaridades distintas de modo que, a separação dos compostos seja realizada de forma mais eficaz. Após a realização do fracionamento, sugere-se que sejam testadas e verificadas as frações bioativas sobre *M. aeruginosa*, bem como a análise da composição fitoquímica dessas frações, de modo a tentar elucidar as substâncias relacionadas com as atividades alelopáticas.

Em relação ao estudo sobre o controle de cianobactérias, sugere-se também, estudos com outras espécies além de *M. aeruginosa*, de modo a verificar se os extratos são eficazes para o combate de outras espécies. Além disso, poderiam ser analisados efeitos sobre alguma espécie de microalga, como teste de sensibilidade, de modo a verificar se esses efeitos seriam específicos para cianobactérias ou afetariam outros componentes do fitoplâncton.

Para estudos com interesse ecológico, sugere-se que, além dos experimentos utilizando extratos e a macrófitas viva em escala laboratorial, seja realizado um estudo de mesocosmos, delimitando uma área em que haja florações de cianobactérias e aplicar a macrófita *M. aquaticum in situ*, para verificar a eficiência de tal remediação em um ambiente natural.

Sugere-se ainda, estudos para analisar a produção de microcistina-LR em um acompanhamento simultâneo da cinética de crescimento, para verificar em qual período há maior produção da cianotoxinas, bem como, para conhecer quando a cianotoxinas é mais produzida.

Por fim, aconselha-se que os experimentos sejam realizados com maior tempo de duração, de modo a conhecer a dinâmica do efeito dos extratos sobre as diferentes fases de crescimento de *M. aeruginosa*, bem como se pode ocorrer alguma resistência e adaptação das mesmas, após um período prolongado de exposição.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. R.; PASSIG, F. H.; PAGIORO, T. A.; NASCIMENTO, P. T. H.; CARVALHO, K. Q. Remoção de microcistina-LR da *Microcystis aeruginosa* utilizando bagaço de cana de açúcar *in natura* e carvão utilizado. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, p. 188-197, 2016.

AMERINE, M. A.; OUGH C. S. **Análisis de Vinos y Mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976.

ANDRADE, I. M.; SILVA, M. F. S.; COSTA, M. C. A.; MAYO, S. J. **Guia de Campo: Macrófitas do Delta do Parnaíba**. 1ª Edição. Joinville: Editora Clube dos autores, 2015, 143 p.

ARSHID, S.; WANI, A. A.; GANIE, A. H.; KHUROO, A. A. On correct identification, range expansion and management implications of *Myriophyllum aquaticum* in Kashmir Himalaya, India. **Chek List**, v. 7, p. 299-302, 2011.

AZEVEDO, S.M.F.O; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil, **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BARROS, S.; GERALDES, A. M.; FERNANDES, C. Avaliação do potencial algicida e algistático de extratos vegetais em *Chlorella vulgaris* e *Anabaena cylindrica*. **CAPTAR -Ciência e Ambiente para todos**, v. 3, p.30-39, 2011.

BARRINGTON, D. J.; REICHWALDT, E. S.; GHADOUANI, A. The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems. **Ecological Engineering**, v. 50, p. 86-94, 2013.

BAUER, N.; BLASCHKE, U.; BEUTLER, E.; GROSS, E.M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; HILT, S. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*, **Aquatic Botany**, v. 91, p. 110-116, 2009.

BORNETTE, G.; PUJALON, S. Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. **Aquatic Sciences**, v. 73, p. 1-14, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.**

BROWNE, S. A. **Aquatic ecosystems.** 1ª Edição. Editora Nova, 2011. 243 p.

CARNEIRO, C.; ANDREOLI, C. V.; CUNHA, C. L.; GOBBI, E.F. **Reservoir Eutrophication: Preventive Management.** 1ª Edição. London: IWA PUBLISHING, 2014. 515 p.

CATHERINE, Q.; SUSANNA, W.; ISIDORA, E.; MARK, H.; AURÉLIE, V.; JEAN-FRANÇOIS, H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. **Water Research**, v. 47, p. 1-16, 2013.

CHENG, W.; XUEXIU, C.; HONGJUAN, D.; DIFU, L.; JUNYAN, L. Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, p. 2595-2603, 2008.

CHAPMAN, D. J.; KREMER, B. P. Experimental phyecology – A laboratory manual. Cambridge: Cambridge University Press. p. 134-140, 1988.

COLLINS, Carol H. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP:UNICAMP, c2006. 453 p.

CORBEL, S.; MOUGIN, C.; MARTIN-LAURENT, F.; CROUZET, O.; BRU, D.; NÉLIEU, S.; BOUAICHA, N. Evaluation of phytotoxicity and ecotoxicity potentials of a cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil-plant system. **Chemosphere**, v. 128, p. 332-340, 2015.

DOOR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v. 56, p. 1247-1256, 2010.

DZIGA, D. et al. The alteration of *Microcystis aeruginosa* biomass and dissolved microcystin-LR concentration following exposure to plant-producing phenols. **Environmental Toxicology**, 22, 341-346, 2007.

EBKE, K. P.; FELTEN, C.; DOREN, L. Impact of heterophylly on the sensitivity of *Myriophyllum aquaticum* biotests. **Environmental Sciences Europe**, v. 25, p. 1-9, 2013.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 826 p.

FERREIRA, T. F. **O papel das macrófitas submersas sobre a qualidade da água, restauração e conservação de lagos rasos subtropicais: estudo de caso, a Lagoa Mangueira, RS** (2009). 164 p. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FRANKLIN, P.; DUNBAR, M.; WHITEHEAD, P. Flows controls on lowland river macrophytes: A review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 369-378, 2008.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 73-81, 2000.

GLAZER, A. N. Directional Energy Transfer in Phycobilisomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, nº1, p. 1-4, 1989.

GHOBRAL, M. G.; NASSR, H. S.; KAMIL, A.W. Bioactivity effect of two Macrophytes extracts on growth performance of two bloom-forming cyanophytes. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 69-81, 2015.

GIANUZZI, L.; SEDAN, D.; ECHENIQUE, R.; ADRINOLO, S. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2164-2175, 2011

GRECA, M.; D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Sterols and fatty acids of the freshwater *Myriophyllum verticillatum*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 629-631, 1989.

GROSS, E.M. Differential response of tellimagrandin II and total bioactive hydrolysable tannins in an aquatic angiosperm to changes in light and nitrogen. **OIKOS**, v. 103, p. 487-504, 2003.

GROSS, E. M.; MEYER, H.; SCHLLING G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. **Phytochemistry**, v. 41, p.133-138, 1996.

GROSS, E.; SUTFELD, R. Polyphenols with algicidal activity in the submerged Macrophytes *M.yriophyllum spicatum* L. **Acta Horticulture**, v. 381, p. 710-716, 1994

GUITIÉRREZ-PRAENA, D.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MORENO, F. J.; CAMMEÁN, A. M. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. **Water Research**, v. 46, p. 1566-1575, 2012.

HAMILTON, T. L.; BRYANT, D.A.; MACALADY, J.L. The role of biology in the planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. **Environmental Microbiology**, v. 18, p. 325-340, 2016.

HAROON, A. M.; ABDEL-AAL, E. I. Chemical composition and *in vitro* anti-algal activity of *Potamogeton crispus* and *Myriophyllum spicatum* extracts. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 393-404, 2016.

HE, X.; CRUZ, A.; HISKIA, A.; KALOUDIS, T.; O'SHEA, K.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins (cyanotoxins) by UV-254 nm-based direct and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reactions mechanisms. **Water Research**, v. 74, p. 227-238, 2015.

HE, Y.; ZHON, Q.; LIU, B.; CHENG, L.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; WU, Z. Programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by allelopathic effect of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* in co-culture system. **Journal Applied of Phycology**, v 28, p. 2805-2814, 2016.

HEISLER; J.; GILBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. M.; ANDERSON, D. M.; COCHLAN, W.; DENISSON, W. C.; DORTCH, Q.; GOBLER, C. J.; HEIL, C. A.; HUMPRIES, E.; LEWITUS, A.; MAGNIEN, R.; MARSHALL, H. G.; SELLNER, K.; STOCKWELL, D.A.; STOECKER, D. K.; SUDDLESSION, M. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. **Harmful Algae**, v. 8, p. 3-13, 2008.

HILT, S.; GROSS, E. M. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilize clear-water states in shallow lakes?. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, p. 422-432, 2008.

HIROOKA, E. Y.; PINOTTI, M. H.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystin in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil, using ELISA. **Natural Toxins**, v. 7, p. 103-109, 1999.

HOLTHOON, F.L.; BEEK, T.A.; LURLING, M.; DONK, E.V.; GROOT, A. Colony formation in *Scenedesmus*: a literature overview and further steps towards the chemical structure characterization of the *Daphnia kairomone*, **Hydrobiologia**, v. 491, p. 241-254, 2003.

HONG, Y.; HU, H.; LI, F. Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl-2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 527-534, 2008a.

HONG, Y.; HU, H.; XIE, X.; LI, F. Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl-2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*), **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1264-1273, 2008b.

HUANG, X.; XIAO, X.; LIN, F.; GROSSART, H.; NIE, Z.; SUN, L.; XU, C.; SHI, J. Continuous-release beads of natural allelochemicals for the long-term control of cyanobacterial growth: Preparation, release dynamics and inhibitory effects. **Water Management** (2016). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.058>> Acesso em: 06 mar. 2016.

HUDNELL, H.K.; LAJTH, A.; PAOLETTI, R. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms**. 1ª Edição. New York: Editora Springer, 2008. 954 p.

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JUNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L. **Manual para cultivo de cianobactérias** (2013). São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 32p.

KAMINSKI, A.; CHRAPUSTA, E.; BOBER, B.; ADAMSKI, M.; LATKOWSKA, E.; BIALCZYNC, J. Aquatic macrophyte *Lemna trisulca* (L.) as a natural factor for reducing anatoxin-a concentration in the aquatic environment and biomass of cyanobacterium *Anaebaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Algal Research**, v. 9, p. 212-217, 2015.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, H.; PÁDUA, C. G.; SOARES, F. S.; BRACARENSE, A.P.F.L.; YABE, M. J. S.; ONO, E.Y.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; SANT'ANA, C.L.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; UENO, Y.; HARADA, K. I.; HIROOKA, E.Y. Monitoring microcystin and physicochemical parameters: Role of

agricultural-aquaculture activity in the water quality. **Mycotoxins and phycotoxins**, v. 1; p. 321-331, 2006.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 1189-1200, 2000.

KUDELA, R. M.; PALACIOS, S. L.; AUSTERBERRY, D.C.; ACCORSI, E. K.; GUILD, L. S.; TORRES-PEREZ, J. Application of hyperspectral remote sensing to cyanobacterial blooms in inland Waters. **Remote Sensing of Environment**, v. 167, p. 196-205, 2015.

LEU, E.; KRIEGER-LISKAY, A.; GOUSSTAS, C.; GROSS, E. M. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic *Myriophyllum spicatum* Inhibit Photosystem II. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2012-2018.

LI, J.; LIU, Y.; ZHANG, P.; ZENG, G.; CAI, X.; LIU, S.; YIN, X.; HU, X.; TAN, X.; Growth inhibition and oxidative damage of *Microcystis aeruginosa* induced by crude extract of *Sagittaria trifolia*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 43. p. 40-47. 2016.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.

LU, Z.; SHA, J.; TIAN, Y.; ZHANG, X.; LIU, B.; WU, Z. Polyphenolic allelochemical pyrogallol acid induces caspase-3 (like)-dependent programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, **Algal research**, v. 21, p.148-155, 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.. **Microbiologia de Brock** (2010). 12 edição, São Paulo: Pearson, 1160p.

MARKO, M D.; GROSS, E. M.; NEWMAN, R. M.; GLEASON, F. K. Chemical profile of the North American native *Myriophyllum sibiricum* compared to the invasive *M. spicatum*. **Aquatic Botany**, v. 88, p. 57-65, 2008.

MATOS, F.V.A. **Introdução à fitoquímica experimental** (2009), 3ª Edição, Ceará: Edições UFC, 128p.

MCCOLL, R. **Phycobiliproteins** (2018), 1ª Edição. Califórnia: CRC Press, 224p.



MEDEIROS, D. R. M. ; LUDKA, V.M. ; CANEPARO, Sony .C. Uso e ocupação do solo da nova sede do município de Campo Magro -PR. In: V Enanppas, Florianópolis - SC. V ENANPPAS - **Encontro Nacional da ANPPAS**, 2010. v. 1. p. 1-17. 2010.

MENG, P.; PEI, H.; HU, W.; LIU, Z.; LI, Z.; XU, H. Allepathic effects of *Alianthus altissima* extracts on *Microcystis aeruginosa* growth, physiological changes and microcystins release. **Chemosphere**, v. 141, p. 219-226, 2015.

MENNAA, F. Z.; ARBIB, Z.; PERALES, J. A. Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and na algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. **Water research**, v. 83, p. 42-51, 2015

MEREL, S.; VILLARÍN, M. C.; CHUNG, K.; SNYDER, S. Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. **Toxicon**, v. 76, p. 118-131, 2013.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2016). **TROPICOS**®. Disponível em:<<http://tropicos.org/>> Acesso em: 13 set. 2016.

NAKAI, S.; INOUE, Y.; HOSOMI, M.; MUURAKAMI, A. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 34, p. 3026-3032, 2000.

NAKAI S, INOUE Y, HOSOMI M, MURAKAMI A. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. **Water Science & Technology**, v.39, p.47-53 1999.

NAKAI, S.; HOSOMI, M.; OKADA, M.; MURAKAMI, A. Control of algal growth by macrophytes and macrophytes-extracted bioactive compounds. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 227-235, 1996.

NI, L.; JIE, X.; WANG, P.; LI, S.; WANG, G.; LI, Y.; LI, Y.; ACHARYA, K. Effect of linoleic acid sustained-release microspheres on *Microcystis aeruginosa* antioxidant enzymes activity and microcystins production, **Chemosphere**, v. 121, p. 110-116, 2015.

NIMPSTSCH, J.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Cyanobacterial toxin elimination via bioaccumulation of MC-LR in aquatic Macrophytes: An Application of the "Green Liver Concept". **Environmental Science & Technology**, v. 42, p.8852-8857, 2008.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D. Efeitos de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clacdad de *Dicksonia sellowiana* (presl.) Hook., Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 18, p. 230-239, 2016.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, p. 313-334, 2012.

OTTEN, T. G.; PAERL, H. W. Health Effects of Toxic Cyanobacteria in U.S. Drinking and Recreational Water: Our Current Understanding and Proposed Direction. **Current environmental health reports**, v. 2, p. 75-84, 2015.

PADIAL, A.A.; BINI, L.M.; THOMAZ, S.M. The study of aquatic macrophytes in Neotropics: a scientometrical view of the main trends and gaps. **Brazilian Journal of Biology**. v. 68, p.1051-1059. 2008.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences and Controls. **Environmental Microbiology**, v. 65, p. 995-1010, 2013.

PAKDEL, F. M.; SIM, L.; BEARDALL, J.; DAVIS, J. Allepathic inhibition of microalgae by the freshwater stonewort, *Chara australis* and a submerged angiosperm *Potamogeton crispus*. **Aquatic Botany**, v. 110, p. 24-30, 2013.

PANTELIC, D.; SVIRCEV, Z.; SIMEUNOVIC, J.; VIDOCVIC, M.; TRAJKOVIC, I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v. 91, p. 421-441, 2013.

PEKAR, H.; WESTERBERG, E.; BRUNO, O.; LAANE, A.; PERSON, K. M.; SUNDSTROM, L. F.; THIM, A. Fast, rugged and sensitive ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for analysis of cianotoxins in raw water and drinking water – First findings of anatoxins, cylindrospermopsins and microcystin variants in Swedish source waters and infiltration ponds. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 265-276, 2016.

PFLUGMACHER, S.; KUHN, S.; LEE, S.; CHOI, J.; BAIK, S.; KWON, K.; CONTARDO-JARA, W. Green Liver Systems® for water purification: Using Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophytes for the Removal of Different

Cyanobacterial Toxins from Water. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1607-1618, 2015

PHAM, T.; SHIMIZU, K.; DAO, T.; HONG-DO, L.; UTSUMI, M. Microcystin uptake and biochemical responses in the freshwater clam *Corbicula leana* P. exposed to toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa*: Evidence of tolerance to cyanotoxins. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 88-98, 2015.

PÔMPEO, M. Monitoramento e Manejo de macrófitas aquáticas. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, p. 406-424, 2008.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 404 p.

PRIETO, A. I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEÁN, A. M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp). **Aquatic Toxicology**, v. 77, p. 314-321, 2006.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M. R.; WOOD., S. A.; CARY, S. C.; HAMILTON, D.P.; WILKINS, A. L. Isolation and structure determination of two new hydrophobic microcystins from *Microcystis* sp. (CAWBG11). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 575-581, 2013.

QIAN, H.; XU, X.; CHEN, X.; JIANG, H.; JIN, Y.; LIU, W.; FU, Z. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 75, p. 368-375, 2009.

QIAN, H.; YU, S.; SUN, Z.; XIE, X.; LIU, W.; FU, Z. Effects of cooper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphtylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 409-412, 2010.

QIMING, X.; H Aidong, C.; HUIXIAN, Z.; DAQIANG, Y. Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on *Microcystis aeruginosa*. **Acta Ecologica Sinica**, v. 26, p. 3549-3554, 2006.

QIN, B.; LI, W.; ZHU, G.; ZHANG, Y.; WU, T.; GAO, G. Cyanobacterial bloom management through integrated monitoring and forecasting in large shallow eutrophic Lake Taihu (China). **Journal of Hazardous of Materials**, v. 287, p. 356-363, 2015.

RAMANAN, R.; KIM, B.; CHO, D.; OH, H.; KIM, H. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. **Biotechnology advances**, v. 34, p. 14-25, 2016.

RANGEL, L.M.; SOARES, M. C. S.; PAIVA, R.; SILVA, L. H. S. Morphology-based functional groups as effective indicators of phytoplankton dynamics in a tropical cyanobacteria-dominated transitional river-reservoir system. **Ecological Indicators**, v. 64, p. 217-227, 2016.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 876 p.

REVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 280 p.

RÍOS, A.; GRUBE, M.; SANCHO, L. G.; ASCASO, C. Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 386-395, 2007

RIZZO, Roberta Ferreira et al . Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. **Food Science & Technol**, v. 35, p. 247-252, 2015 .

ROMERO-OLIVA, C. S.; CONTARDO-JARA, V.; PFLUGMACHER, S. Antioxidative response of the three macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata* to a time dependent exposure of cell-free crude extractions containing three microcystins from cyanobacterial blooms of Lake Amatitlán, Guatemala. **Aquatic toxicology**, v. 163, p.130-139, 2015.

SAITO, K.; MATSUMOTO, M.; SEKINE, T.; MURAKOSHI, I. Inhibitory substances from *Myriophyllum brasiliense* on growth of blue-green algae, **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1221-1226, 1989.

SANTOS, A. O. M. E.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Hepatotoxicidade associada à microcistina. **Semina: Agrárias Londrina**, v. 29, p. 417-430, 2008.

SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. **Cyanobacteria**. 1ª Edição. Nova Jersey: Editora Wiley-Blackwell, 2013. 386 p.

SHAO, J.; LI, R.; LEPO, E.; GU, J. Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: Problems and prospects. **Journal of Environment Management**, v. 125, p. 149-155, 2013.

SILVEIRA, A. L. **AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing**. (2012), 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento** (2010). 6ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 1104 p.

SOLIS, M.; PAULIK-SKOWRONSKÁ, B.; KALINOWSKA, R. Seasonal changes of phytoplankton and cyanobacteria/cyanotoxin risk in two shallow morphologically altered lakes: Effect of water level manipulation (Wieprz-Krzna Canal System, Eastern Poland). **Ecological indicators**, v. 66, p. 103-112, 2016.

SOUZA, F. A.; DZIEDZIC, M.; CUBAS, S. A.; MARANHO, L. T. Restoration of polluted Waters by phytoremediation using *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc., Haloragaceae. **Journal of Environmental Management**, v. 120, p. 5-9, 2013.

SVANYS, A.; EIGERMANN, F.; GROSSART, H.; HILT, S. Microcystins do not necessarily lower the sensitivity of *Microcystis aeruginosa* to tannic acid. **Microbiology letters**, v. 363 p. 1-4, 2016.

TAKSER, L.; BENACHOUR, N.; CABANA, H.; GRIS, D. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 180-189, 2016.

THOMAZ, S. M.; MORMUL, R. P.; MICHELAN, T. S. Propagule pressure, invisibility of freshwater ecosystems by macrophytes and their ecological impacts: a review of tropical freshwater ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 746, p. 39-59, 2015.

TORRES, Mariana de Almeida. **Avaliação da Inativação de *Microcystis aeruginosa* Kützing por Processo Foto-Fenton**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado acadêmico) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

TOUZET, N.; MCCARTHY, D.; GILL, A.; FLEMING, G.T.A. Comparative summer dynamics of surface cyanobacterial communities in two connected lakes from the wets of Ireland. **Science of the Total Environment**, v. 553, p. 416-428, 2016.

TUNDISI, J. G. **Água no século 21: enfrentando a escassez**. RIMA/III, 2013. 247p.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURATUNDISI, T. **Limnology** (2012). 1ª. edição. Londres: CRC, Taylor&Frances. 863p

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Recursos hídricos no século XXI**. São Paulo: Oficina de textos, 2011. 328 p.

VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorous in natural waters. **Marine Chemistry**, v. 10, p. 109-122, 1981.

VASCONCELOS, J. F.; BARBOSA, J. E. L.; LIRA, W.; AZEVEDO, S. M. F.O. Microcystin bioaccumulation can cause potential mutagenic effects in farm fish. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 185-192, 2013.

XU, Y.; YANG, J.; OU, M.; WANG, Y.; JIA, J. Study of *Microcystis aeruginosa* inhibition by electrochemical method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 215-220, 2007.

WANG, H.; LIU, F.; LUO, P.; LI, Z.; ZHENG, L.; WANG, H.; ZOU, D.; WU, J. Allelopathic effects of *Myriophyllum aquaticum* on two cyanobacterial of *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*. **Bullet Environment Containants & Toxicology**, v. 98, p. 556-561, 2017.

WANG, H.; CHENG, S.; ZHANG, S.; HE, F.; LIANG, W.; ZHANG, L.; HU, C.; GE, F.; WU, Z. Chemical Composition in Aqueous extracts of *Potamogeton malaianus* and *Potamogeton maackianus* an their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa*. **Published Journal of Environmental studies**, v. 19, p.213-218, 2010.

WANG, J.; LIU, Q.; FENG, J.; LV, J.; XIE, S. Effects of high-doses pyrogallol on oxidative damage, transcriptional responses and microcystins synthesis in *Microcystis aeruginosa* TY001 (cyanobacteria). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 272-279, 2016.

WANG, M.; LIU, Z.; LUO, F.; LEI, G.; LI, H. Do Amplitudes of Water Level Fluctuations Affect the Growht and Community Structure od Submerged Macrophytes? **Plos One**, v. 11, p. 1-12, 2015.

WERSAL, R. M.; CHRSCHEER, J. C.; MADSEN, J. D.; GERARD, P. D. Phenology, starch allocation, and environmental effects on *Myriophyllum aquaticum*. **Aquatic Botany**, v. 95, p. 194-199, 2011.

WERSAL, R. M.; MADSEN, J.D. Comparative effects of water level variations on growth characteristics of *Myriophyllum aquaticum*. **Weed research**, v. 51, p. 386-393, 2010.

WICHELEN, J. V.; VANORMELINGEN, P.; CODD, G. A.; VYVERMAN, W. The common bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* is prone to a wide array of microbial antagonists. **Harmful Algae**, v. 55, p. 91-111, 2016.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure – A review of the literature. **Environmental International**, v. 91, p. 276-282, 2016.

YAN, H. Y.; ZHANG, X. R.; DONG, J. H.; SHANG, M. S.; SHAN, K.; WU, D.; YUAN, Y.; WANG, X.; MENG, H.; HUANG, Y.; WANG, G. Y. Spatial and temporal relation rule acquisition of eutrophication in Da'ning River based on rough set theory. **Ecological Indicators**, v. 66, p. 180-189, 2016.

ZHANG, T.; LIU, L.; YANG, X.; ZHANG, S.; XIA, W.; LI, C. Allelopathic control of freshwater phytoplankton by the submerged macrophyte *Najas minor* All. **Acta Ecologica Sinica**, v. 34, p. 351-355, 2014.

ZHANG, M.; ZHANG, Y.; YANG, Z.; WEI, L.; YANG, W.; CHEN, C.; KONG, F. Spatial and seasonal shifts in bloom-forming cyanobacteria in Lake Chaochu: Patterns and driving factors. **Phycological Research**, v. 64, p. 44-55, 2016.

ZHOU, M.; TU, W.; XU, J. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. **Toxicon**, v. 101, p. 92-100, 2015.

ZHOU, Q.; HAN, S.; YAN, S.; GUO, J.; SONG, W.; LIU, G. Impacts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms stress on the physiological characteristics, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 148-155, 2014.

ZHU, J.; LIU, B.; WANG, J.; GAO, Y.; WU, Z. . **Aquatic Toxicology**, v. 98, p. 196-203, 2010.