

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

AUGUSTO LIMA DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis*
aeruginosa Kützing**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2012

AUGUSTO LIMA DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis*
aeruginosa Kützing**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Curitiba, como requisito parcial para a obtenção do título de “Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental” – Área de concentração: Avaliação de Bacias Hidrográficas.

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro;

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Rocha Martins.

CURITIBA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S587 Silveira, Augusto Lima da
Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützinger / Augusto Lima da Silveira. — 2012.
xv, 113 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Thomaz Aurélio Pagioro.

Coorientadora: Lucia Regina Rocha Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2012.

Bibliografia: f. 102-113.

1. Recursos Hídricos – Análise. 2. Macrófitas aquáticas – Testes. 3. *Microcystis aeruginosa*. 4. Microcistinas. 5. Alelopatia. 6. Tecnologia ambiental – Dissertações. I. Pagioro, Thomaz Aurélio, orient. II. Martins, Lucia Regina Rocha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD (22. ed.) 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Campus Curitiba

TERMO DE APROVAÇÃO

AUGUSTO LIMA DA SILVEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis* *aeruginosa* KÜTZING.

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do grau de mestre no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Membro:

Prof. Dr. Luciano Felício Fernandes
Programa de Pós-Graduação em Botânica
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Membro:

Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Curitiba, 15 de agosto de 2012

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA).

*Aos meus pais, José e Madalena
Aos meus irmãos, Carolina e Saulo
Dedico este trabalho*

“Só desperta paixão por aprender, quem tiver paixão em ensinar.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me abençoar com a força necessária para vencer os obstáculos da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro, por ter acreditado novamente em meu trabalho, por todo o seu empenho para que o estudo fosse possível e pela amizade.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Rocha Martins, pela dedicação ao estudo e pelas sugestões sempre muito sensatas.

Ao Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira, da Universidade Federal de São Carlos, por fornecer o inóculo da cianobactéria que possibilitou a realização dos experimentos.

À Prof. Dr^a. Marlene Soares pela ajuda com as incertezas em relação ao inóculo e por sempre se mostrar disposta a ajudar.

À Prof. Dr^a. Fátima de Jesus Bassetti pelo apoio e pelas dicas que facilitaram muito a montagem e realização dos experimentos.

À minha amiga Joana Rupprecht Zablonsky pelo auxílio nas análises, pela amizade e por ter compartilhado das conquistas e das dificuldades ao longo do mestrado.

Aos meus amigos de mestrado Fernanda Scuissiatto, Giancarlo Tomazzoni, Luana Jesus Oliveira e Renan Viesser pela grande contribuição com materiais, conhecimentos e incertezas ao longo das análises.

Ao Ricardo Mellegari de Oliveira pelo auxílio com as coletas das macrófitas aquáticas.

À Giovana Caraballo Melatti pela realização dos testes de toxicidade e por se mostrar sempre disposta a me ajudar nos experimentos.

À UTFPR ao PPGCTA e ao DAQBI pela estrutura fornecida.

À minha família, por compreender as ausências durante este período.

Aos meus pais Madalena e José pelo amor incondicional e por serem o meu grande presente nesta vida.

À minha irmã Carol por toda a amizade, carinho e pelo respeito de sempre.

Ao meu amigo/irmão Linconl Mendes de Lima, por encarar junto comigo a missão “em busca da cianobactéria”. Agradeço também pela paciência, força e por sempre ter me incentivado a prosseguir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todas as pessoas que torcem por mim, meu muito obrigado!

RESUMO

SILVEIRA, Augusto Lima. **Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützing**. 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

As cianobactérias se proliferam rapidamente em ambientes eutrofizados e podem ser capazes de sintetizar toxinas que inviabilizam a utilização dos recursos hídricos. A espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta ampla distribuição, além de ser potencial produtora de hepatotoxinas denominadas microcistinas. O risco à saúde humana destas substâncias faz com que os métodos para controle destes microrganismos na água adquiram fundamental importância. De forma a verificar possíveis efeitos inibitórios de compostos fitoquímicos produzidos por macrófitas aquáticas sobre o crescimento e a produção de microcistinas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, o presente estudo utilizou extratos hidroalcoólicos de sete espécies de macrófitas aquáticas (*Eichhornia azurea*, *Eleocharis cf. acutangula*, *Ludwigia cf. peruviana*, *Myriophyllum cf. aquaticum*, *Pontederia cordata*, *Sagittaria montevidensis* e *Typha domingensis*). O meio de cultura ASM-1 foi otimizado em relação ao pH, nitrogênio, fósforo e ferro através de planejamento fatorial. Para o preparo dos extratos, as sete espécies de macrófitas aquáticas foram coletadas, processadas e submetidas ao processo de extração com solução hidroetanólica 80% (v/v). Os extratos obtidos foram liofilizados e aplicados em concentrações conhecidas aos cultivos de *M. aeruginosa*, em meio ASM-1 otimizado. O monitoramento da concentração celular foi realizado a cada 48 h por 10 dias. As diferenças estatísticas foram avaliadas através do método estatístico ANOVA *repeated*. A determinação da concentração de microcistina-LR foi realizada nas culturas contendo a concentração de extrato de maior efeito inibitório. Para a verificação de efeitos bacteriostáticos e bactericidas, ao final do período testado, os cultivos foram reinoculados em tubos de ensaio contendo apenas o meio de cultura estéril. Os extratos foram avaliados quanto à presença de metabólitos secundários e à toxicidade aguda sobre *Daphnia magna*. Os experimentos apresentaram valores de crescimento elevados no meio que continha maiores concentrações de P e Fe. Os extratos inibiram significativamente o crescimento da cepa quando foram aplicados na concentração de 500 mg.L⁻¹, com exceção do extrato obtido a partir de *S. montevidensis* em que o efeito inibitório sobre as células foi o menor observado. O extrato com maior efeito inibitório foi obtido de partes aéreas de *M. cf. aquaticum* pois a taxa de inibição foi de 99,1% na concentração de 500 mg.L⁻¹. As análises de microcistina evidenciaram que para o extrato de *E. cf. acutangula* a redução do crescimento foi acompanhada de aumento na produção de microcistina-LR de 216 para 610 ppb. Nos testes com o extrato de *S. montevidensis* a concentração de toxina sofreu pouca alteração, aumentando de 216 para 222 ppb. Efeitos bactericidas foram verificados para a exposição aos extratos de *E. cf. acutangula*, *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum*, uma vez que após reinoculadas não foram verificados crescimentos celulares. Para os extratos de *E. azurea*, *P. cordata* e *T. domingensis* não foram observados efeitos tóxicos, por outro lado, a maior toxicidade ocorreu para *S. montevidensis*, pois 100% dos organismos apresentaram imobilidade na concentração de 50 mg.L⁻¹. Considerando os dados de inibição e de toxicidade foi possível constatar que o extrato obtido de *L. cf. peruviana* apresentou maiores vantagens em sua aplicação. Os resultados obtidos indicam a possibilidade futura da aplicação de extratos para a remediação de florações e mostram, também, a necessidade de investigações fitoquímicas e toxicológicas mais detalhadas no sentido de identificar as substâncias ativas no controle de florações, de forma a potencializar a ação destas e minimizar seus efeitos tóxicos.

Palavras-chave: *Microcystis aeruginosa*. Macrófitas aquáticas. Alelopatia. Inibição. Microcistinas.

ABSTRACT

SILVEIRA, Augusto Lima. **Evaluation of inhibitory effect of aquatic macrophytes hydroalcoholic extracts on *Microcystis aeruginosa* Kützing growth.** 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Cyanobacteria proliferate rapidly in eutrophic environments and may be able to synthesize toxins that block water resources use. The cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is widely distributed, being a potential producer of hepatotoxins called microcystins. The risks to human health of these substances demands methods to control these microorganisms in water. In order to investigate possible inhibitory effects of phytochemical compounds produced by aquatic macrophytes on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*, the present study used aquatic macrophytes hydroalcoholic extracts of seven species (*Eichhornia azurea*, *Eleocharis cf. Acutangula*, *Ludwigia cf. peruviana*, *Myriophyllum cf. aquaticum*, *Pontederia cordata*, *Sagittaria montevidensis* and *Typha domingensis*). The culture medium ASM-1 was optimized with respect to pH, nitrogen, phosphorus and iron through a factorial design. For extracts preparation, the seven species of aquatic macrophytes were collected, processed and submitted to extraction process solution ethanol 80% (v/v). The extracts were lyophilized and applied in known concentrations to cultures of *M. aeruginosa*, in optimized ASM-1 medium. Cell concentration was determined every 48 h for 10 days. Statistical differences were evaluated using ANOVA repeated. The microcystin-LR concentration was determined in cultures containing greater inhibitory effect extract concentration. Evaluation of bacteriostatic and bactericidal effects at the end of tested period, the cultures were reinoculated into test tubes containing only sterile culture medium. The extracts were evaluated for the presence of secondary metabolites and acute toxicity on *Daphnia magna*. The experiments showed high growth rates in medium containing higher concentrations of P and Fe. Hydroalcoholic extracts inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* strain, more effective when applied at a concentration of 500 mg L⁻¹, except for tests performed with *S. montevidensis* in that the mean inhibitory effect on the cells was the lowest observed. The extract with the highest inhibitory effect was obtained from aerial parts of *M. cf. aquaticum* in which the inhibition rate was 99.1%. The analyzes showed that microcystin for the extract of *E. cf. acutangula* the greatest cellular inhibition was accompanied by an increase in microcystin-LR production from 216 to 610 ppb. In tests with *S. montevidensis* extract the concentration of toxin was few changed, increasing from 216 to 222 ppb. Bactericidal effects were observed for exposure to extracts of *E. cf. acutangula*, *L. cf. peruviana* and *M. cf. aquaticum*. For extracts of *E. azurea*, *P. cordata* and *T. domingensis* toxic effects were not observed. The major toxicity was observed for *S. montevidensis*, in which 100% of organisms presented immobility in concentration of 50 mg.L⁻¹. Considering inhibition and toxicity data was found that *L. cf. peruviana* extract showed more advantages on its application. The results indicate the possibility of future application of extracts for blooms remediation and also show the need for detailed toxicological and phytochemical investigations in order to identify the active compounds in blooms control and minimize their toxic effects.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*. Aquatic macrophytes. Allelopathy. Inhibition. Microcystins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOBACTÉRIAS	20
3.2 AS TOXINAS SINTETIZADAS POR CIANOBACTÉRIAS	22
3.3 MONITORAMENTO E CONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS	25
3.4 AS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	27
3.5 EFEITOS ALELOPÁTICOS ENTRE MACRÓFITAS AQUÁTICAS E CIANOBACTÉRIAS	31
3.6 PRINCIPAIS CLASSES DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	37
4.2 PARÂMETROS ANALÍTICOS	39
4.2.1 Determinação da concentração celular por contagem	39
4.2.2 Determinação da fluorescência	41
4.2.3 Determinação dos pigmentos celulares	41
4.3 VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	43
4.4 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM MEIO ASM-1	43
4.5 PREPARO DOS EXTRATOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS	46
4.5.1 Processos de extração	47
4.5.2 Preparo dos extratos para os testes	49
4.6 TESTES DE INIBIÇÃO	49
4.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS	52
4.8 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR	53

4.8.1 Esteróides e triterpenos	53
4.8.2 Saponinas	54
4.8.3 Taninos e fenóis.....	54
4.8.4 Flavonóides	54
4.8.5 Fenólicos totais	55
4.9 ENSAIOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CIANOBACTÉRIA E CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	57
5.1.1 Determinação da concentração celular por contagem.....	58
5.1.2 Determinação da fluorescência	59
5.1.3 Determinação dos pigmentos celulares	61
5.2 VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	64
5.3 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM MEIO ASM-1.....	66
5.4 PREPARO DOS EXTRATOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS.....	71
5.5 TESTES DE INIBIÇÃO	72
5.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS	84
5.6 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR	87
5.6.1 Esteróides e triterpenos	88
5.6.2 Saponinas.....	89
5.6.3 Taninos e fenóis.....	89
5.6.4 Flavonóides	91
5.6.5 Fenólicos totais.....	93
5.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS.....	94
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
REFERÊNCIAS.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das soluções-estoque e o volume utilizado para o preparo do meio de cultura ASM-1	38
Tabela 2 - Níveis experimentais inferior (-) e superior (+) para as variáveis utilizadas na otimização do cultivo da cianobactéria	44
Tabela 3 - Desenho experimental do sistema de cultivo para as variáveis pH, N, P e Fe	44
Tabela 4 - Quantidade inicial de vegetal pulverizado e o método utilizado para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos.	48
Tabela 5 - Coloração, resultante da mudança nos valores de pH, para cada classe de flavonóides	55
Tabela 6 - Comparação entre os métodos de determinação da concentração celular (células.mL ⁻¹) utilizados para as culturas de <i>M. aeruginosa</i>	58
Tabela 7 - Planejamento fatorial e crescimento médio verificado para <i>M. aeruginosa</i> nas condições testadas durante a primeira etapa do planejamento fatorial, em níveis experimentais inferiores (-) e superiores (+).....	66
Tabela 8 - Planejamento fatorial e crescimento médio verificado para <i>M. aeruginosa</i> nas condições testadas durante a segunda etapa do planejamento fatorial, em níveis experimentais inferiores (-) e superiores (+).....	68
Tabela 9 - Rendimentos de extração em etanol 80% (v/v) para as espécies de macrófitas aquáticas de estudo.....	71
Tabela 10 - Taxas de inibição celular média (\pm desvio padrão) para <i>M. aeruginosa</i> , observadas com os extratos de macrófitas aquáticas em concentrações efetivas (n=3), em que N ₀ e N indicam a concentração celular no recipiente controle e no recipiente teste, respectivamente, após 10 dias de experimento, e TI a taxa de inibição calculada.....	81
Tabela 11 - Concentração celular média (\pm desvio padrão), em tubos de ensaio, no momento da reinoculação e após 10 dias de cultivo em meio ASM-1 estéril sem adição de extratos (n=3).....	82
Tabela 12 - Concentração de microcistina-LR, dos experimentos de inibição, contendo 500 mg.L ⁻¹ dos extratos testados após 10 dias de exposição, relacionada com a concentração celular (n=1).	85

Tabela 13 - Resultado das análises qualitativas de esteróides e triterpenos para os oito extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, com as respectivas codificações utilizadas.....	88
Tabela 14 - Resultado das análises qualitativas de taninos e fenóis para os oito extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, com as respectivas codificações utilizadas	90
Tabela 15 - Valores médios (\pm desvio padrão) de compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas (n=3).....	94
Tabela 16 - Valores percentuais de imobilidade para <i>D. magna</i> , após exposição por 48 h aos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas e controles (n=4).....	95
Tabela 17 - Concentrações de extratos de macrófitas aquáticas e da substância de referência (KCl) utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> ..	96
Tabela 18 - Valores de CE(50) para os ensaios de toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das espécies de macrófitas aquáticas	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Florações de cianobactérias do gênero <i>Microcystis</i> . a) Lago Taihu, China b) Rio St. Johns, Estados Unidos c) Reservatório Iraí, PR d) Represa Guarapiranga, SP.	22
Figura 2 - Estrutura geral das microcistinas, formada de sete aminoácidos principais, sendo dois variáveis (R1 e R2).	24
Figura 3 - Representação de macrófitas aquáticas classificadas com base no habitat. 1) anfíbia, 2) emergente, 3) flutuante fixa, 4) flutuante livre, 5) submersa fixa, 6) submersa livre, 7) epífita.	28
Figura 4 - Espécies de macrófitas aquáticas presentes na região de Curitiba. a) <i>E. azurea</i> , b) <i>E. acutangula</i> , c) <i>L. peruviana</i> , d) <i>P. cordata</i> , e) <i>T. domingensis</i> , f) <i>S. montevidensis</i> , g) <i>M. aquaticum</i>	30
Figura 5 - Estrutura da glicirrizina, exemplo estrutural de saponina.....	34
Figura 6 - Estrutura genérica de alguns compostos fenólicos. Os flavonóides: a) flavonol, b) flavona. Os taninos: c) ácido gálico, d) ácido elágico	35
Figura 7 - Estrutura da quinina, um exemplo estrutural de alcalóide.....	36
Figura 8 - Representação dos campos de contagem da câmara de Neubauer, suas dimensões e sentidos de contagem.	39
Figura 9 - Experimento de otimização do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> . a) planejamento com tubos em triplicata, b) planejamento simples com <i>erlenmeyers</i>	45
Figura 10 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas através do processo de maceração 48 h.....	47
Figura 11 - Desenho esquemático do procedimento experimental adotado durante os testes de inibição.....	50
Figura 12 - Esquema de montagem do frasco de cultivo, para os testes de inibição.	50
Figura 13 - Caracterização do inóculo de <i>M. aeruginosa</i> . a) Visualização a fresco em microscópio óptico (400x aumento) b) Coloração de Gram (aumento 1000x e óleo de imersão) c) Coloração com tinta nanquim (aumento 1000x e óleo de imersão).	57
Figura 14 - Correlação entre a concentração celular e a intensidade de fluorescência para as diluições de <i>M. aeruginosa</i>	60
Figura 15 - Correlação entre a concentração celular e a intensidade de fluorescência para as diluições intermediárias de <i>M. aeruginosa</i>	60

Figura 16 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de clorofila-a para as diluições de <i>M. aeruginosa</i>	62
Figura 17 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de ficobiliproteínas totais para as diluições de <i>M. aeruginosa</i>	62
Figura 18 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de clorofila-a para as diluições intermediárias de <i>M. aeruginosa</i>	63
Figura 19 - Curvas de crescimento, baseadas em valores médios de contagem, da cepa BB005 (<i>M. aeruginosa</i>) utilizando diferentes concentrações celulares iniciais. Barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).	64
Figura 20 - Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos em relação à concentração celular em diferentes condições nutricionais, durante a primeira etapa do planejamento fatorial. A barra vertical indica o erro experimental padronizado (n=3).	67
Figura 21 - Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos em relação à concentração celular em diferentes condições nutricionais, ao final da segunda etapa do planejamento fatorial (n=1).	68
Figura 22 - Aspecto dos cultivos de <i>M. aeruginosa</i> ao final da segunda etapa do planejamento fatorial 2 ⁴ (n=1). C1-C3: controles.	70
Figura 23 - Concentração de clorofila-a nas condições nutricionais testadas durante o planejamento fatorial (n=1), em relação ao tempo de cultivo.	70
Figura 24 – Valores médios de crescimento da cepa BB005 de <i>Microcystis aeruginosa</i> exposta aos extratos obtidos de raízes de <i>M. cf. aquaticum</i> , em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).....	73
Figura 25 - Valores médios de crescimento da cepa BB005 de <i>Microcystis aeruginosa</i> exposta aos extratos obtidos de partes aéreas de <i>M. cf. aquaticum</i> , em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).....	73
Figura 26 - Valores médios de fluorescência da cepa BB005 de <i>Microcystis aeruginosa</i> exposta aos extratos obtidos de partes aéreas de <i>M. cf. aquaticum</i> , em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).....	74
Figura 27 – Aspecto inicial dos testes de inibição da cepa BB005 de <i>M. aeruginosa</i> a) utilizando extratos obtidos das raízes de <i>M. cf. aquaticum</i> b) com extrato das partes aéreas desta.....	75
Figura 28 - Valores médios de crescimento da cepa BB005 de <i>M. aeruginosa</i> exposta aos extratos obtidos. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3). a) <i>Eichhornia azurea</i> ; b) <i>Eleocharis cf. acutangula</i> ; c) <i>Ludwigia cf. peruviana</i> ; d) <i>Pontederia cordata</i> ; e) <i>Sagittaria montevidensis</i> ; f) <i>Typha domingensis</i>	77

Figura 29 - Valores médios de fluorescência da cepa BB005 de <i>M. aeruginosa</i> exposta aos extratos obtidos. Barras verticais indicam o desvio padrão (n=3). a) <i>Eichhornia azurea</i> ; b) <i>Eleocharis cf. acutangula</i> ; c) <i>Ludwigia cf. peruviana</i> ; d) <i>Pontederia cordata</i> ; e) <i>Sagittaria montevidensis</i> ; f) <i>Typha domingensis</i>	80
Figura 30 - Aspecto das reinoculações realizadas em tubos de ensaio (n=3) das amostras provenientes dos testes de inibição, após 10 dias de cultivo, com a respectiva numeração	83
Figura 31 - Correlação entre a concentração de microcistina-LR e a absorbância ...	85
Figura 32 - Coloração obtida após acidificação com H ₂ SO ₄ das soluções clorofórmicas provenientes dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas (Ei: <i>E. azurea</i> , El: <i>E. cf. acutangula</i> , MP: <i>M. cf. aquaticum</i> partes aéreas, MR: <i>M. cf. aquaticum</i> raízes, L: <i>L. cf. peruviana</i> , P: <i>P. cordata</i> , S: <i>S. montevidensis</i> , T: <i>T. domingensis</i>)	88
Figura 33 - Amostras obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, após neutralização, durante o teste confirmatório para saponinas (Ei: <i>E. azurea</i> , El: <i>E. cf. acutangula</i> , MP: <i>M. cf. aquaticum</i> partes aéreas, MR: <i>M. cf. aquaticum</i> raízes, L: <i>L. cf. peruviana</i> , P: <i>P. cordata</i> , S: <i>S. montevidensis</i> , T: <i>T. domingensis</i>)	89
Figura 34 - Amostras obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, após adição de FeCl ₃ , durante o teste para taninos e fenóis (Ei: <i>E. azurea</i> , El: <i>E. cf. acutangula</i> , MP: <i>M. cf. aquaticum</i> partes aéreas, MR: <i>M. cf. aquaticum</i> raízes, L: <i>L. cf. peruviana</i> , P: <i>P. cordata</i> , S: <i>S. montevidensis</i> , T: <i>T. domingensis</i>) .	90
Figura 35 - Soluções de extrato submetidas à pH 3,0; 8,0 e 11,0. Tubos organizados em ordem crescente de pH da esquerda para direita (Ei: <i>E. azurea</i> , El: <i>E. cf. acutangula</i> , MP: <i>M. cf. aquaticum</i> partes aéreas, MR: <i>M. cf. aquaticum</i> raízes, L: <i>L. cf. peruviana</i> , P: <i>P. cordata</i> , S: <i>S. montevidensis</i> , T: <i>T. domingensis</i>)	92
Figura 36 - Correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, e a absorbância	93
Figura 37 - Carta-controle de sensibilidade para ensaios de toxicidade aguda utilizando <i>Daphnia magna</i> ; substância de referência: KCl	97

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, uma série de fatores tem influenciado a qualidade das águas superficiais no planeta. Essa influência é o reflexo, muitas vezes, das intensas modificações pelas quais têm passado os recursos hídricos para que estes possibilitem o desenvolvimento das atividades humanas. Como consequência, observam-se impactos ambientais, sociais e econômicos, cujos custos são frequentemente subestimados (GLEICK, 2003).

As fontes de água doce do planeta provenientes de rios, lagos e de aquíferos subterrâneos somam 0,4 a 1,0% dos quais apenas 0,10 a 0,15% estão disponíveis para o uso humano (HOTLOS, 2008). A escassez e a má utilização trazem grandes desafios à gestão de recursos hídricos no mundo, uma vez que a água é fundamental para o desenvolvimento da vida no planeta e, em contrapartida, a qualidade da mesma apresenta-se bastante deteriorada (OKI; KANAE, 2006).

O descarte de efluentes domésticos é um dos fatores responsáveis pela degradação da qualidade da água, cuja principal consequência é a eutrofização. O aporte de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, provoca mudanças na cadeia alimentar, favorecendo a dominância de cianobactérias (FERRÃO-FILHO; MOLICA; AZEVEDO 2009).

As cianobactérias estão naturalmente presentes em ecossistemas aquáticos, constituindo parte do fitoplâncton; entretanto, as altas concentrações desses organismos estão associadas a problemas estéticos, presença de odores desagradáveis, inviabilização do abastecimento público e de atividades recreacionais (FALCONER, 1999).

O principal agravante, associado à presença de cianobactérias em ambientes aquáticos, é a produção de toxinas nas águas para abastecimento público. As cianotoxinas, como são chamadas as toxinas sintetizadas por cianobactérias, podem colocar a saúde da população em risco devido aos efeitos ao sistema nervoso e hepático (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Os estudos envolvendo as cianobactérias em águas para o abastecimento público tiveram grande destaque no meio científico a partir de 1996, após o incidente ocorrido no Brasil em uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru (PE). Na

ocasião, cerca de 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, dos quais 76 morreram nos meses seguintes (CARMICHAEL et al., 2001).

Alguns fatores como o conhecimento prévio da estabilidade molecular das microcistinas e a similaridade entre os sintomas apresentados pelos pacientes afetados e os animais expostos a estas toxinas, reforçaram a hipótese de que as mortes foram causadas por cianotoxinas (JOCHIMSEN et al., 1998). Análises realizadas após o incidente evidenciaram a presença de microcistinas no sangue dos pacientes afetados. Além disso, foram observadas deformações celulares, necroses e conseqüente rompimento de regiões do fígado (AZEVEDO et al., 2002).

A partir do ocorrido em Pernambuco, as intoxicações ocasionadas por cianotoxinas, mais especificamente as hepatotóxicas, ficaram conhecidas como a “Síndrome de Caruaru”; desde então, medidas de controle foram adotadas através do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas, em águas para abastecimento público (CARMICHAEL et al., 2001). De acordo com a portaria n°. 2914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde a quantificação de cianobactérias deve ser realizada mensalmente e o limite máximo permitido para microcistinas deve ser de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

A falta de condições necessárias para a manutenção dos corpos aquáticos livres das grandes descargas de nutrientes, a conseqüente eutrofização dos mesmos, aliada à grande capacidade adaptativa que as cianobactérias desenvolveram durante sua evolução, têm feito com que sejam cada vez mais frequentes as chamadas “florações” em ambientes aquáticos (SANT’ANNA et al., 2006).

Em locais eutrofizados, pode ocorrer também o crescimento intenso de macrófitas aquáticas que, em casos extremos, é responsável por restringir os usos múltiplos dos recursos hídricos (POMPÊO, 2008).

Os estudos têm demonstrado também que em condições de competição, as macrófitas aquáticas podem liberar substâncias provenientes de seu metabolismo secundário, tais como taninos e outros compostos fenólicos, originando o fenômeno denominado alelopatia (NAKAI et al., 1999; ZHU et al., 2010; ZHANG et al., 2011). A existência deste fenômeno tem sido descrita como um dos fatores responsáveis por controlar a densidade fitoplanctônica (MULDERIJ; SMOLDERS; VAN DONK, 2006; MULDERIJ et al., 2007).

Em 1949, Hasler e Jones, verificaram que a presença de vegetais aquáticos em lagos foi acompanhada de menores densidades da população fitoplanctônica e que, possivelmente, a secreção de algumas substâncias antibióticas estava contribuindo para que efeitos inibitórios fossem observados. Nos estudos de coexistência realizados por Nakai et al. (1999) os efeitos inibitórios, de macrófitas aquáticas sobre cianobactérias, observados foram atribuídos a mecanismos alelopáticos, uma vez que, de acordo com os autores, estes organismos competem por luz e nutrientes disponíveis no local em que vivem. Investigando estes mecanismos naturais, Zhu et al. (2010) constataram que a liberação dos ácidos gálico e pirogálico foi responsável por danificar o sistema fotossintético da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* o que causou a inibição do crescimento celular. Outra característica observada foi a ocorrência de efeitos sinérgicos entre outros compostos fitoquímicos, como o ácido elágico e catequinas, também presentes no vegetal.

Considerando a presença de substâncias oriundas do metabolismo secundário de vegetais superiores com potencial efeito alelopático, o presente estudo propõe a aplicação de extratos hidroalcoólicos obtidos de espécies nativas de macrófitas aquáticas, com o intuito de verificar sua atividade inibitória *in vitro* e a viabilidade no controle de florações de cianobactérias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar efeitos inibitórios *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de espécies de macrófitas aquáticas sobre o crescimento e a produção de microcistina pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer a cinética de crescimento da cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa*;
- Otimizar o crescimento celular de maneira a favorecer as taxas de duplicação;
- Avaliar a precisão de métodos diretos e indiretos para determinação do crescimento microbiano;
- Avaliar a presença de atividade inibitória dos extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de *Microcystis aeruginosa*;
- Verificar a existência de efeitos sobre a produção de microcistina, provenientes da exposição aos extratos hidroalcoólicos;
- Caracterizar os extratos quanto à presença de classes de metabólitos secundários;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas produzidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOBACTÉRIAS

A divisão *Cyanophyta* pertence ao reino *Eubacteria*, em que estão classificados taxonomicamente os organismos procarióticos, e é composta por aproximadamente 2000 espécies em 150 gêneros. As cianobactérias, como são chamados os organismos pertencentes à divisão *Cyanophyta*, possuem elevada diversidade morfológica, além de colonizar uma grande variedade de ambientes, incluindo locais com condições extremas como as regiões polares e desérticas (HOEK; MANN; JOHNS, 1995).

As cianobactérias são organismos autotróficos aeróbios, cuja origem estimada é de 3,5 bilhões de anos, sendo provavelmente os primeiros produtores primários a liberarem oxigênio na atmosfera primitiva (CARMICHAEL, 1994). A Era Proterozóica ficou conhecida como a “Era das Cianobactérias” devido à grande quantidade de evidências fósseis da presença desses organismos. A colonização dos ambientes pelas cianobactérias até os dias atuais se deu graças ao longo período evolucionário, que permitiu o desenvolvimento de mecanismos específicos para o domínio dos ecossistemas (WHITTON; POTTS, 2000).

Um mecanismo bastante característico deste grupo de organismos é a capacidade que certas espécies possuem em fixar o nitrogênio atmosférico, através de células vegetativas especializadas denominadas de heterocitos. Nestas células, uma parede celular espessa é responsável por impedir a entrada de oxigênio, criando um ambiente redutor favorável ao funcionamento da enzima nitrogenase, que é catalisadora das reações de fixação do nitrogênio molecular (BERGMAN et al., 1997).

Outras modificações nas estruturas celulares ao longo da evolução das cianobactérias estão relacionadas principalmente à influência da radiação solar e da disponibilidade de nutrientes em seus processos metabólicos. Para regular a intensidade de radiação ou encontrar condições nutricionais mais adequadas, as espécies aquáticas regulam a profundidade na coluna de água, através de vacúolos gasosos. Tal característica lhes garante grande vantagem competitiva no domínio do ambiente (FALCONER, 2005).

O aproveitamento da radiação para a síntese de carboidratos é realizado através de um aparato fotossintético muito semelhante ao de plantas superiores, porém a maior parte da energia luminosa é absorvida por cromoproteínas específicas denominadas ficobiliproteínas, compostas por pigmentos de coloração vermelha, as ficoeritrinas (PE), e azuis, as ficocianinas (PC) e aloficocianinas (AP) (LIOTENBERG et al., 1996). Estas proteínas absorvem a radiação luminosa na região não retida pela clorofila-a (regiões do verde, amarelo e laranja – entre 500 a 650 nm) e convertem essa energia para que possa ser utilizada na fotossíntese (FATMA, 2009), o que lhes confere outra vantagem competitiva frente aos demais organismos fitoplancônicos (CHORUS; BARTRAM, 1999).

As cianobactérias eram inicialmente conhecidas como *cianofíceas* ou *algas azuis*, devido à presença da ficocianina e da aloficocianina, e também por apresentarem a autotrofia característica de algas eucarióticas. Porém a natureza procariótica das células, semelhante às bactérias, fez com que a denominação “cianobactérias” ganhasse maior destaque no meio científico (HOEK; MANN; JOHNS, 1995; SANT’ANNA et al., 2006).

Apesar da grande variedade de ambientes colonizados pelas cianobactérias, é nos ecossistemas aquáticos que elas predominam e, sob condições de elevada luminosidade e disponibilidade de nutrientes, são capazes de sintetizar toxinas que podem inviabilizar a utilização dos recursos hídricos durante as “florações” (CARMICHAEL, 1994). Quando o ambiente apresenta uma elevada concentração de cianobactérias em relação ao fitoplâncton total, utiliza-se o termo *floração*, para se referir à dominância destas espécies (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* Kützing pertence ao gênero que apresenta maior distribuição pelo planeta e que está presente durante a maioria dos eventos de floração (Figura 1). São organismos de formato cocóide, não fixadores de nitrogênio, encontrados na natureza sob a forma de colônias pleomórficas (sem forma definida) (VISSER et al., 2005; SANT’ANNA et al., 2006). A denominação microcistina, dada a uma das subdivisões de cianotoxinas hepatotóxicas, ocorreu devido a estas serem primeiramente identificadas no gênero *Microcystis* (VISSER et al., 2005).

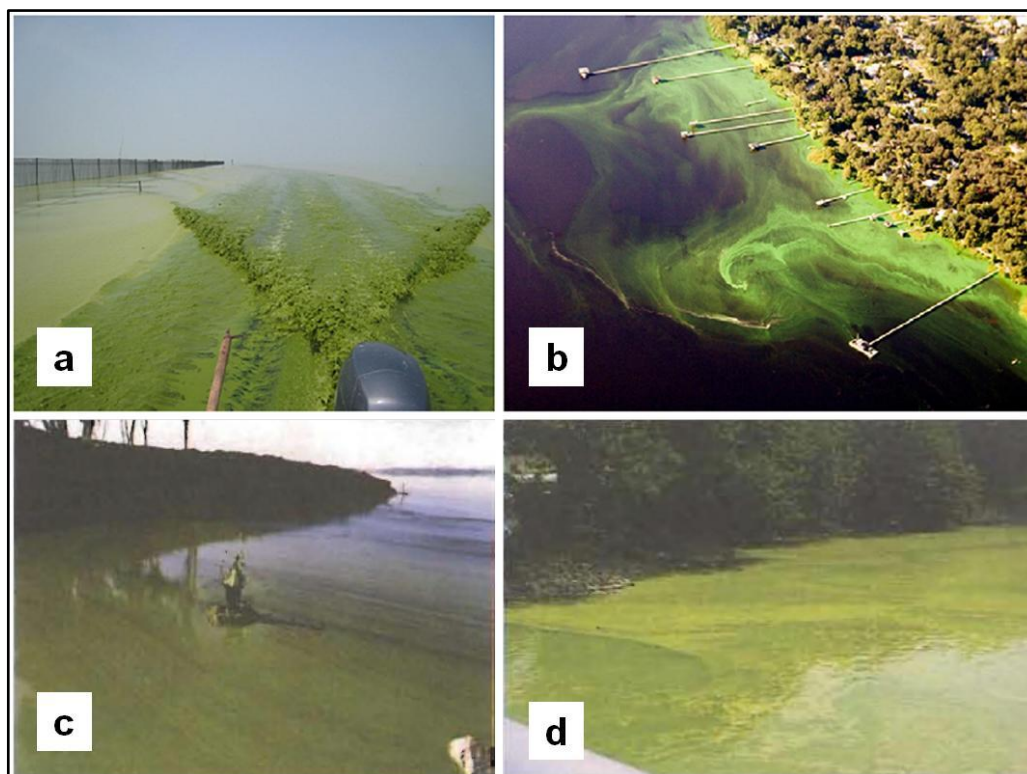


Figura 1 - Florações de cianobactérias do gênero *Microcystis*. a) Lago Taihu, China b) Rio St. Johns, Estados Unidos c) Reservatório Iraí, PR d) Represa Guarapiranga, SP.

Fonte: Paerl e Paul (2012, p. 1350); Di Bernardo, Minillo e Dantas (2010, p. 498)

Em condições laboratoriais de cultivo, as células podem deixar de formar agregados celulares (colônias), que é uma de suas características naturais considerada estratégia de defesa. (REYNOLDS et al., 1981). O mecanismo está baseado na separação incompleta durante as divisões reprodutivas, bem como no aumento do número de vacúolos gasosos. Desta forma os organismos localizados dentro da colônia são protegidos por uma barreira externa de células, que as protegem contra fatores externos como, por exemplo, a predação e a fotoinibição (ZHANG et al., 2011; YANG; KONG, 2012).

3.2 AS TOXINAS SINTETIZADAS POR CIANOBACTÉRIAS

Dentro do grupo Cyanophyta já foram identificados mais de 40 espécies, divididas em 25 gêneros, como potenciais produtoras de toxinas e que podem afetar a saúde dos seres vivos (DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010), dentre os quais *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*,

Nostoc e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) são reportados como os principais formadores de florações tóxicas (CARMICHAEL, 2001).

A produção de toxinas por cianobactérias apresenta grande variação temporal, além de ser fortemente influenciada pelas condições ambientais (AZEVEDO, 1998). O mecanismo de produção das cianotoxinas não é completamente conhecido, porém verifica-se que as condições favoráveis ao crescimento de cianobactérias, são também propícios para a produção de toxinas, uma vez que foram observadas correlações positivas entre a disponibilidade de fósforo, nitrogênio, intensidade luminosa e a produção de microcistinas (SIVONEM; JONES, 1999; KARDINAAL; VISSER, 2005).

De uma forma geral, não é possível prever se as florações serão tóxicas ou não, isso porque mesmo uma espécie reportada como tóxica pode, devido às condições de crescimento, não produzir toxinas. Por este motivo, além da identificação de espécies, é fundamental a realização de análises para detectar a presença de cianotoxinas, de forma a prever e reduzir os riscos associados à presença destas substâncias (CARMICHAEL, 1992).

As cianotoxinas são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e classificados quimicamente em três grandes grupos: lipopolissacarídeos (LPS), alcalóides e peptídeos cíclicos, que apresentam atividade dermatotóxica, neurotóxica e hepatotóxica, respectivamente. As dermatotoxinas são lipopolissacarídeos componentes da membrana celular e, assim como para a maioria das bactérias gram-negativas patogênicas, causam dermatites e inflamações gastrointestinais. As neurotoxinas são responsáveis por afetar a transmissão de impulsos nervosos, relacionados à contração e relaxamento muscular. Os alcalóides neurotóxicos são subdivididos em anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas que, dependendo da concentração, podem causar a morte por insuficiência respiratória (CARMICHAEL, 1994; SIVONEM; JONES, 1999).

Os peptídeos cíclicos são as toxinas que ocorrem com maior frequência nos ambientes aquáticos e, por este motivo, são as principais causadoras de intoxicação aguda por cianotoxinas. As hepatotoxinas foram inicialmente subdivididas em microcistinas e nodularinas (CARMICHAEL, 1992), porém mais recentemente verificou-se a produção de um alcalóide hepatotóxico denominado cilindrospermopsina, que pode afetar outros órgãos além do fígado em mamíferos (FALCONER, 2005).

As microcistinas são as moléculas mais estudadas entre as cianotoxinas, sendo produzidas principalmente pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. São moléculas solúveis em água, encontrados sob mais de 80 variações e massa molecular média de 1000 Da (WESTRICK et al., 2010).

As microcistinas possuem sete aminoácidos, sendo a sua estrutura geral (Figura 2) D-alanine-R1-D-MeAsp-R2-Adda-D-glutamate-Mdha; onde o D-MeAsp é o D-eritro ácido metilaspártico, Mdha é N-metildeidroalanina e ADDA é o ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (EDWARDS; LAWTON, 2010).

A representação R1 e R2 são os dois L aminoácidos variáveis, cuja presença determina o nome das microcistinas, como por exemplo, microcistina-LR (leucina-arginina), microcistina-RR (arginina-arginina), microcistina-YA (tirosina-alanina) (CHORUS; BARTRAM, 1999).

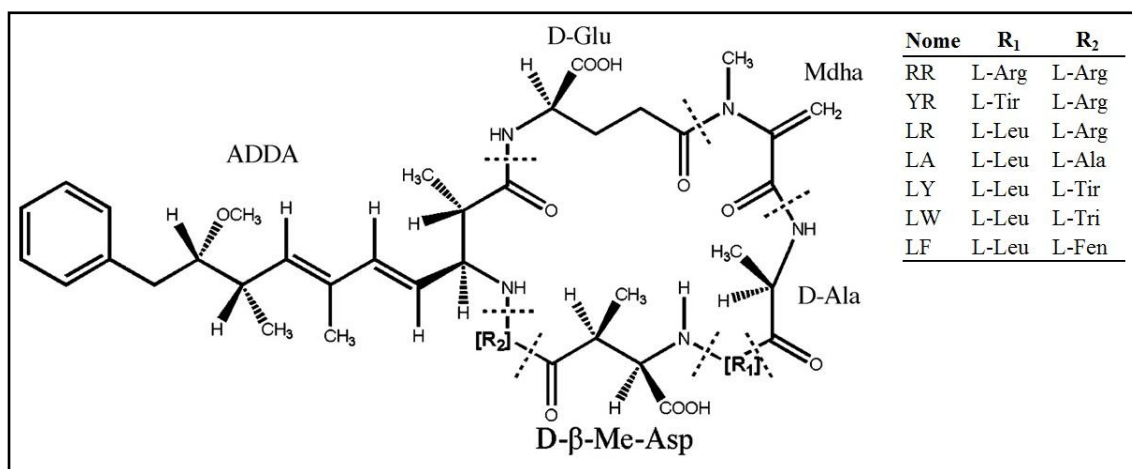


Figura 2 - Estrutura geral das microcistinas, formada de sete aminoácidos principais, sendo dois variáveis (R1 e R2).

Fonte: adaptado de Chorus e Bartram (1999, p. 59)

As microcistinas são potentes inibidoras de proteínas fosfatases e a exposição crônica a pequenas doses da toxina pode contribuir para o desenvolvimento de câncer hepático, como foi verificado nos estudos realizados por Nishiwaki-Matsushima et al. (1992) e Ueno et al. (1996), em que elevadas correlações entre os índices de câncer e o consumo de água contaminada com microcistinas, pela população de Guangxi na China, foram observadas.

Em exposições agudas, esse grupo de toxinas alcança as células do fígado, através de receptores de ácidos biliares, e promove a desorganização do citoesqueleto. Como consequência, o órgão desenvolve uma série de lesões e hemorragias intra-hepáticas que, em casos mais graves, podem ocasionar a morte do organismo afetado (CARMICHAEL, 1994)

A maioria dos estudos está focado nas microcistinas, por estas serem as cianotoxinas de maior ocorrência no mundo todo e as responsáveis por vários casos de intoxicação de animais e seres humanos (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

O potencial das microcistinas em causar efeitos adversos à saúde humana e aos ecossistemas aquáticos tende a se agravar, considerando as atuais condições de eutrofização e mudanças climáticas às quais os corpos hídricos estão sujeitos. Estudos recentes (EL-SHEHAWY et al., 2012) demonstraram que o aumento das temperaturas, resultante do aquecimento global, pode favorecer a dominância de espécies hepatotóxicas de cianobactérias, uma vez que os genes responsáveis pela produção das microcistinas são melhores expressos nestas condições.

O efeito sinérgico entre a alta concentração de nutrientes e as elevadas temperaturas poderá favorecer florações tóxicas mais intensas e de elevada duração nos próximos anos (BROOKES; CAREY, 2011; PAERL; PAUL, 2012); esses dados reforçam a necessidade e importância de estudos relacionados ao controle de cianobactérias e suas toxinas.

3.3 MONITORAMENTO E CONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

A legislação brasileira estabelece limites para a presença de cianobactérias e cianotoxinas em águas para consumo humano. Através da Portaria nº. 518 de março de 2004, o Ministério da Saúde estabelece os padrões de potabilidade da água. Dentre as características para o abastecimento encontra-se a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias, o limite máximo permitido de microcistinas totais, estabelecido em $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, além da recomendação para a análise de saxitoxinas (limite de $3,0 \mu\text{g}$ equivalente STX.L⁻¹) (BRASIL, 2004), baseados nas concentrações propostas pela Organização Mundial da Saúde em 1998 (WHO, 1998).

A Portaria n°. 518 determina que o monitoramento do fitoplâncton deve ocorrer mensalmente, no ponto de captação, quando a concentração de cianobactérias for inferior a $10.000 \text{ células.mL}^{-1}$, e semanalmente, caso a concentração exceda este valor. Para ambientes com mais de $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$, fica proibida a utilização de algicidas ou outros métodos de controle que provoquem a lise das células, além de tornar-se obrigatória a análise semanal de cianotoxinas. Tal restrição se deve ao fato das hepatotoxinas serem produzidas e armazenadas dentro das células (endotoxinas), e liberadas para a coluna d'água quando estas são danificadas (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Mais recentemente, a Portaria n°. 518 foi revogada pela Portaria n°. 2914 de dezembro de 2011. Nesta, foram determinados limites mais restritivos para as concentrações de cilindrospermopsinas (de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$), além da recomendação para que se façam análises de anatoxina-a(s) (limite de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$), ao se verificar a presença de gêneros potencialmente produtores de tais cianotoxinas (BRASIL, 2011).

Para atender aos atuais padrões estabelecidos, algumas medidas mitigadoras de florações têm sido desenvolvidas no sentido de prevenir ou, em casos emergenciais, reduzir os efeitos adversos resultantes das florações.

A redução na entrada de nutrientes em ambientes aquáticos é a principal medida para a prevenção e controle efetivo de florações, porém o alto custo e o longo período necessário para a redução na população de cianobactérias tornam o processo inviável nos padrões de desenvolvimento atuais. Desta forma, algumas medidas emergenciais de curto prazo foram desenvolvidas, com o objetivo de tornar a água segura para o abastecimento, recreação, atividades industriais e para a aquicultura (JANCULA; MARSALEK, 2011).

As medidas emergenciais para o controle dos efeitos adversos das florações são baseadas, principalmente, em processos físicos e químicos. A filtração por membranas, a oxidação, desinfecção por UV, aplicação de espécies metálicas e o emprego de carvão ativado em pó ou granular são alguns dos exemplos das alternativas mais utilizadas no tratamento de água em períodos de floração (WESTRICK et al., 2010; JANCULA; MARSALEK, 2011).

A baixa viabilidade de aplicação destas tecnologias envolve os elevados custos para o tratamento de grandes reservatórios, os subprodutos tóxicos que são muitas vezes gerados ao final dos processos e as remoções incompletas. Desta

forma, os estudos focados na remediação de florações a partir de alternativas naturais, como a inserção controlada de consumidores ou a alelopatia, têm evidenciado novas alternativas para o controle de cianobactérias (XIE; LIU, 2001; WU et al., 2011).

3.4 AS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

As macrófitas aquáticas são vegetais que devido a processos evolutivos, após terem colonizado ambientes terrestres, retornaram aos sistemas aquáticos. A evidência deste processo está na presença de algumas estruturas específicas de vegetais terrestres como estômatos (não funcionais para a maioria das espécies) e uma fina cutícula. São capazes de colonizar os mais variados ambientes, desde a água acumulada em bromeliáceas até os grandes sistemas aquáticos (SCREMIN-DIAS et al., 1999).

Estes vegetais são importantes componentes dos ecossistemas aquáticos, pois representam cerca de 95% da biomassa presente nestes ambientes, além de determinarem uma grande parte das relações tróficas quando estão presentes (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003).

De acordo com Pott e Pott (2000) as macrófitas aquáticas podem ser classificadas de acordo com seu habitat (Figura 3) ou grupo ecológico como:

- *Anfíbias*: são capazes de se desenvolver em ambientes alagados ou fora da água;
- *Emergentes*: enraizados no sedimento e parcialmente submersos;
- *Flutuantes fixas*: enraizados no sedimento, apresentando em alguns casos caule, ramos e folhas flutuantes;
- *Flutuantes livres*: não enraizados no sedimento desenvolvendo-se flutuando livremente na coluna d'água;
- *Submersas fixas*: enraizados no sedimento com caule e folhas submersos;
- *Submersas livres*: não fixos ao sedimento e totalmente submersos;
- *Epífitas*: com desenvolvimento sobre outros vegetais aquáticos.

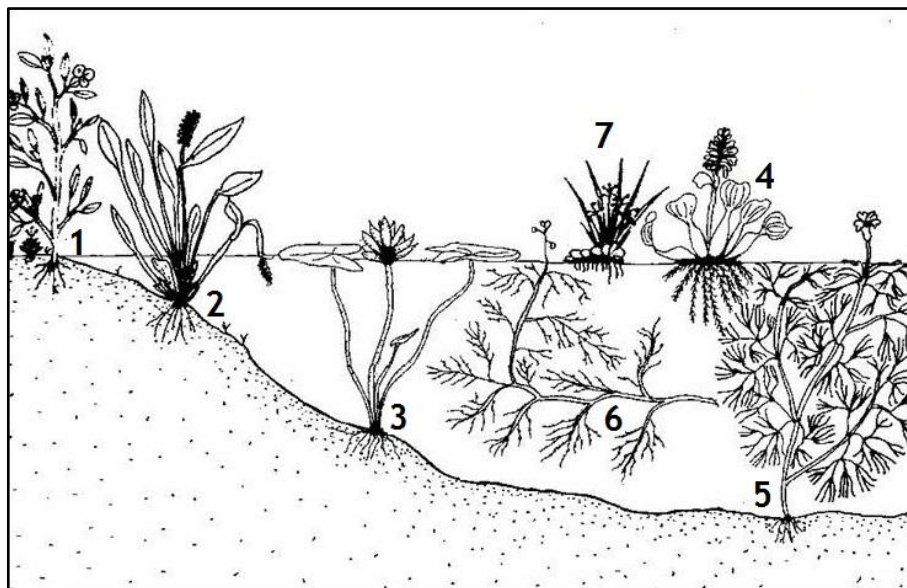


Figura 3 - Representação de macrófitas aquáticas classificadas com base no habitat. 1) anfíbia, 2) emergente, 3) flutuante fixa, 4) flutuante livre, 5) submersa fixa, 6) submersa livre, 7) epífita.
Fonte: Pott e Pott (2000, p. 37)

Quando se apresentam em equilíbrio no ambiente, as macrófitas são de grande importância na ciclagem dos compostos presentes na água, atuando como controladoras da eutrofização pela retirada de nutrientes, além de combater o crescimento intenso do fitoplâncton (XAVIER; DIAS; BRUNKOW, 2005).

De acordo com Silva (2011), as pesquisas que abordam a composição das espécies de macrófitas aquáticas no Brasil se concentram nas regiões centro-oeste, sul e principalmente sudeste, sendo possível verificar que as espécies mais comuns em reservatórios brasileiros são: *Azolla caroliniana* Willd. (azola, tapete d'água), *Egeria densa* Planch. (elodea, erva d'água), *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé, baronesa), *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth (dama do lago, baronesa), *Lemna valdiviana* Phil. (lentilha-da-água, pasta-miúda), *Pistia stratiotes* L. (alface d'água, lentilha d'água), *Salvinia auriculata* Aubl. (carrapatinho, erva-de-sapo) e *Wolffia brasiliensis* Wedd. (lodinho-verde).

Estudos realizados no estado do Paraná têm indicado a presença de grande diversidade de espécies de macrófitas aquáticas, sendo que as famílias Araceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Hydrocharitaceae, Poaceae, Pontederiaceae e Salviniaceae são relatadas nos recursos hídricos da região (BINI et al., 1999; KITA; SOUZA, 2003).

Verificações realizadas em campo na região de Curitiba, estado do Paraná, puderam evidenciar a presença de diversas espécies de vegetais aquáticos. As características e a distribuição de alguns destes organismos são descritas a seguir.

A espécie *Eichorna azurea* (Sw.) Kunth (Figura 4 a) pertencente à família Pontederiaceae, apresenta-se na natureza sob a forma submersa quando jovem e flutuante fixa ao completar seu desenvolvimento. Tem sua distribuição do México ao Uruguai, sendo considerada uma espécie invasora graças à sua elevada capacidade de dispersão, além disso, possui brotos e flores comestíveis (POTT; POTT, 2000).

A macrófita *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Steud. (cebolinha d'água) é uma das representantes da família Cyperaceae e é classificada como emergente (Figura 4 b). Apresenta elevada distribuição pelo planeta, ocorrendo principalmente no México, Austrália, África, Índia, Japão, América Central e América do Sul (AMARAL et al., 2008).

A espécie *Ludwigia peruviana* (L.) Hara (cruz-de-malta) é uma das representantes da família Onagraceae (Figura 4 c), sendo classificada como emergente. Estão distribuídas dos Estados Unidos até a Argentina e Uruguai; no Brasil, estão presentes principalmente da Amazônia a São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. As sementes deste vegetal servem de alimento para aves (SCREMIN-DIAS et al., 1999).

Myriophyllum aquaticum (Vell.) Verdc., popularmente conhecida como pinheirinho-d'água (Figura 4 g), é uma espécie do tipo submersa fixa pertencente à família Haloragaceae. Distribuiu-se em regiões temperadas e tropicais da América, nativa da América do Sul. Espécie considerada daninha, uma vez que o crescimento é intenso chegando, em alguns casos, a impedir o fluxo normal da água (SCREMIN-DIAS et al., 1999).

A espécie *Pontederia cordata* L. var. *cordata* (guapé, lanceiro) é uma planta aquática do tipo emergente que pertence à família Pontederiaceae (Figura 4 d). Apresenta ampla distribuição pelas Américas, da Argentina ao sul dos Estados Unidos. Possui sementes e pecíolos jovens comestíveis, além de ser utilizada em tratamento de efluentes domésticos (POTT; POTT, 2000).

A macrófita aquática *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schltdl (chapéu-de-couro, aguapé de flecha) é um vegetal do tipo submerso ou emergente e pertence à família Alismataceae (Figura 4 f). Ocorre do Equador e Peru, até o Uruguai e norte do Chile. No Brasil pode ser encontrada do leste da região Sudeste até o Rio

Grande do Sul. São invasoras de canais de irrigação e seus frutos servem de alimento para aves (AMARAL et al., 2008).

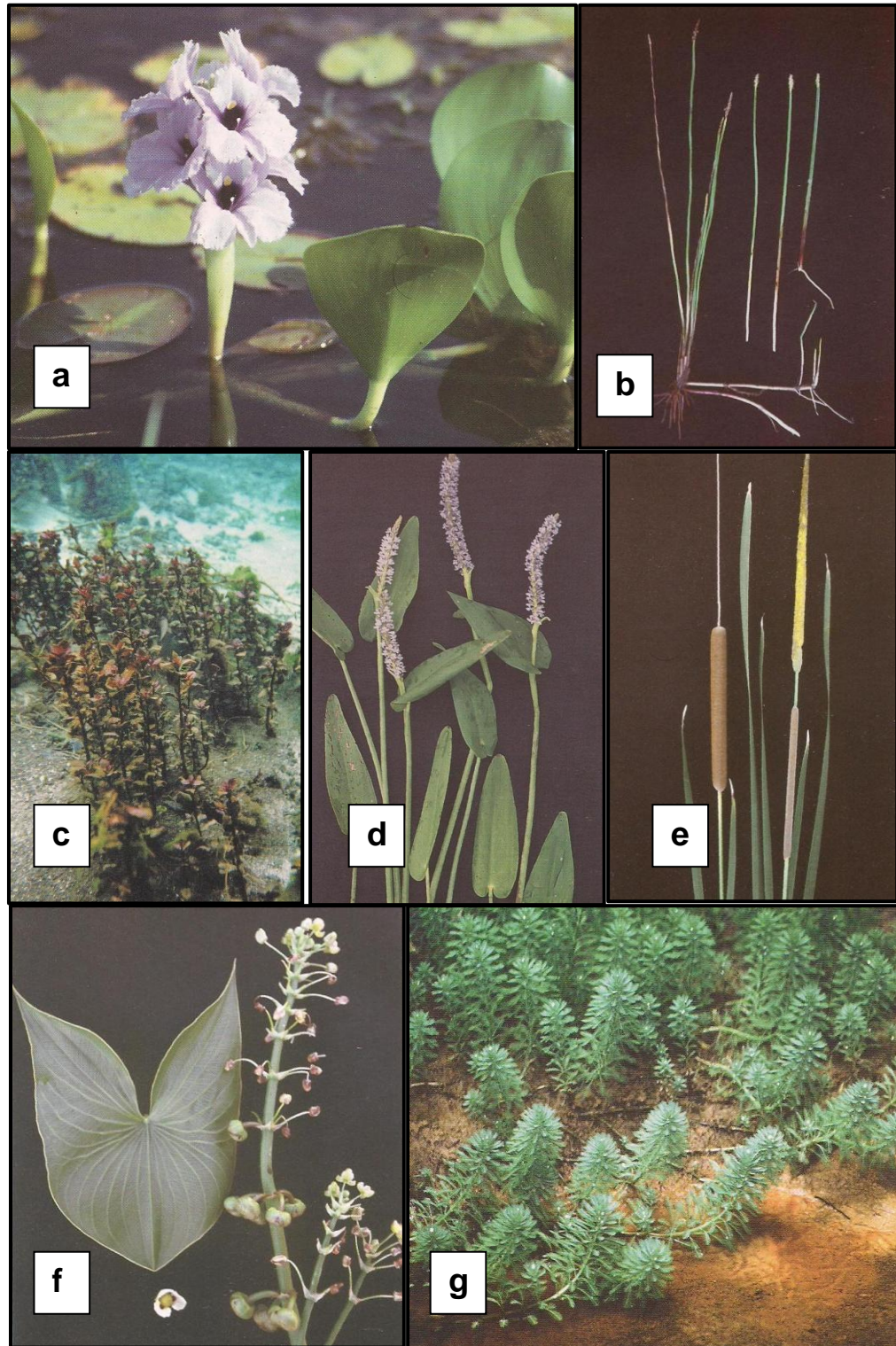


Figura 4 - Espécies de macrófitas aquáticas presentes na região de Curitiba. a) *E. azurea*, b) *E. acutangula*, c) *L. peruviana*, d) *P. cordata*, e) *T. domingensis*, f) *S. montevidensis*, g) *M. aquaticum*
 Fonte: Scremin-Dias et al. (1999); Pott e Pott (2000); Amaral et al. (2008)

A espécie *Typha domingensis* Pers. (taboa) pertence à família Typhaceae (Figura 4 e) e é uma macrófita do tipo emergente. Apresenta ampla distribuição pelo planeta ocorrendo na Europa, Ásia, Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá e Brasil. Toda sua estrutura é comestível e contém quantidade de proteína compatível com a encontrada no milho (POTT; POTT, 2000).

A presença destes organismos está condicionada às características ambientais como a composição do sedimento, turbidez da água, disponibilidade de nutrientes e a ação de herbívoros. O aparecimento destes vegetais pode também ser induzido pelas modificações antrópicas nos recursos hídricos (BIANCHINI JUNIOR, 2003).

Em ambientes eutrofizados, o excesso de nutrientes torna favorável a reprodução das macrófitas aquáticas, cujo crescimento ocorre rapidamente e sua decomposição ou sombreamento da coluna d'água contribuem para a redução dos níveis de oxigênio da água, comprometendo a vida aquática local e os usos múltiplos dos recursos hídricos (KALFF, 2003).

3.5 EFEITOS ALELOPÁTICOS ENTRE MACRÓFITAS AQUÁTICAS E CIANOBACTÉRIAS

Os produtores primários de ambientes aquáticos estão, frequentemente, inseridos em condições de severa competição por recursos tais como espaço, disponibilidade de luz e de nutrientes e, por este motivo, a alelopatia é utilizada como estratégia para a propagação da espécie. O termo *alelopatia* foi definido por Molisch¹ (1937 apud GROSS, 2003, p. 313) como sendo interações bioquímicas de inibição ou estímulo ao crescimento, entre produtores primários, decorrentes da liberação de compostos químicos específicos denominados aleloquímicos.

Os estudos relacionados à alelopatia entre macrófitas aquáticas e o fitoplâncton surgiram a partir da metade do século XX e diversas espécies já foram identificadas, desde então, como produtoras de compostos com efeito algicida. Os polifenóis constituem o grupo de aleloquímicos mais relatados com tais propriedades (HU; HONG, 2008). A alelopatia em ambientes aquáticos apresenta características

¹ MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1937.

que a torna complexa e susceptível a inúmeras variáveis ambientais. A presença da água limita a efetividade de ação de alguns aleloquímicos, já que para atingir o organismo-alvo de forma efetiva, estes compostos devem ser hidrofílicos e apresentarem-se em concentrações efetivas, pois a diluição nesses ecossistemas exerce grande influência sobre seu efeito (GROSS, 2003).

De forma a reduzir interferências, investigar a influência de variáveis no efeito alelopático e elucidar seus mecanismos, os estudos envolvendo efeitos inibitórios entre macrófitas aquáticas e cianobactérias têm sido realizados de duas maneiras gerais (HU e HONG, 2008):

Utilizando macrófitas aquáticas vivas – O teste é baseado na dissolução das substâncias aleloquímicas no meio de cultura líquido, em que as macrófitas se desenvolveram, e a adição de volumes conhecidos deste à culturas contendo organismos-teste (CHENG et al., 2008). Outro método para este tipo de teste ocorre através de culturas mistas entre algas e macrófitas, simulando a coexistência natural (NAKAI et al., 1999; ZHU et al., 2010). A desvantagem de estudos realizados desta forma deve-se ao seu caráter apenas exploratório, pois é possível evidenciar o fenômeno, sem que seja possível identificar os compostos químicos responsáveis, já que as baixas concentrações de fitoquímicos, verificados nestas condições, podem inviabilizar a sua detecção e quantificação;

Utilizando macrófitas aquáticas secas – as plantas secas são normalmente pulverizadas e passam por processos de extração com solventes, sendo posteriormente evaporadas até a obtenção de extratos concentrados (SAITO et al., 1989; LI; HU, 2005; D'ABROSCA et al., 2006). Esses extratos secos são dissolvidos, aplicados em cultivos celulares *in vitro*. A dissolução do extrato é feita normalmente com auxílio de algum solvente orgânico, como dimetilsulfóxido (DMSO), que tem a finalidade de aumentar a solubilidade do extrato no meio de cultura (YI et al., 2011). Neste modelo experimental, além de evidenciar os efeitos alelopáticos, é também possível, em experimentos subsequentes, realizar a purificação do extrato e a identificação do(s) composto(s) responsáveis pelo efeito alelopático observado.

Os mecanismos pelos quais as substâncias alelopáticas podem interferir nos processos vitais de cianobactérias ainda não são completamente conhecidos, porém os estudos apontam para duas vias principais de ação, como a alteração no sistema enzimático celular e o bloqueio no sistema fotossintético, fatores que podem inviabilizar o desenvolvimento das células como foi verificado por Dziga et al. (2007).

Dentre as cianobactérias reportadas em estudos de alelopatia, a inibição de *Microcystis aeruginosa* tem sido investigada em experimentos com espécies de macrófitas aquáticas tais como *Myriophyllum spicatum*, como foi verificado por Leu et al. (2002) e Zhu et al. (2010). As principais características, observadas pelos autores, foram a redução nas taxas de fotossíntese de até 71,43% e a inibição celular resultante dos danos ao aparato fotossintético. Cheng et al. (2008) observaram que a espécie de macrófita aquática *Myriophyllum aquaticum* foi responsável por reduzir em até 52,7% as concentrações de clorofila-a nos cultivos de *M. aeruginosa*. A espécie *Thalia dealbata*, em estudo realizado por Zhang et al. (2011), apresentou atividade inibitória às células de *M. aeruginosa* comprovada através da redução de 92,7% de clorofila-a. Li e Hu (2005) constataram que os aleloquímicos isolados da macrófita aquática *Phragmites communis* causaram alterações no sistema enzimático celular que justificaram os efeitos inibitórios observados.

As substâncias ativas relatadas nestes estudos como as principais responsáveis pela redução nas populações de *M. aeruginosa* são os fenóis e os taninos (principalmente o ácido gálico).

Neste contexto, os efeitos inibitórios proporcionados pela presença de compostos ativos originados de espécies vegetais poderão contribuir para o desenvolvimento de métodos naturais para o controle de florações.

3.6 PRINCIPAIS CLASSES DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS

Nos vegetais, as vias metabólicas podem ser divididas em metabolismo primário, cujos processos envolvem funções essenciais ao vegetal tais como a fotossíntese e a respiração; e metabolismo secundário que compreende a síntese de compostos que não são diretamente utilizados em processos vitais e estão relacionados à interação do organismo com o ambiente (SANTOS, 2004).

Através do metabolismo secundário, substâncias aleloquímicas são produzidas e encontradas em diferentes partes das plantas, em concentrações que variam de acordo com o ciclo de vida e as características do organismo (ALMEIDA et al., 2008).

A alelopatia, que ocorre devido à liberação de metabólitos secundários, é resultante da ação de diferentes compostos fitoquímicos determinada não só pela concentração de substâncias isoladas, mas também pela interação entre elas através de efeitos sinérgicos (SOUZA FILHO, 2006).

Os metabólitos secundários podem ser genericamente divididos em três grandes classes: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (COLOMA et al, 2011).

Os terpenos ou terpenóides constituem um grupo de substâncias vegetais que apresentam grande variedade estrutural, sendo esta denominação relacionada a todos os compostos que são biossintetizados a partir de unidades de isopreno. Os compostos terpênicos comumente estão presentes em óleos vegetais, cujas características odoríferas atraem polinizadores ou protegem a planta contra predadores (SIMÕES; SPITZER, 2004). No grupo dos compostos terpênicos estão incluídos os triterpenos (resultantes da ciclização do esqualeno) e os esteróides. Alguns destes compostos agem em inflamações, possuem efeito analgésico, além de propriedades bactericidas. Dentre os importantes triterpenos de origem vegetal estão as saponinas (SANTOS, 2004).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial da água, apresentam ação emulsificante e detergente, devido à presença de características lipofílicas e hidrofílicas na mesma molécula. Suas propriedades biológicas estão relacionadas com a sua capacidade de destruir membranas celulares, através da alteração da permeabilidade. A Figura 5 apresenta a estrutura de uma saponina triterpênica denominada glicirrizina, para qual têm sido atribuídos efeitos antivirais (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004).

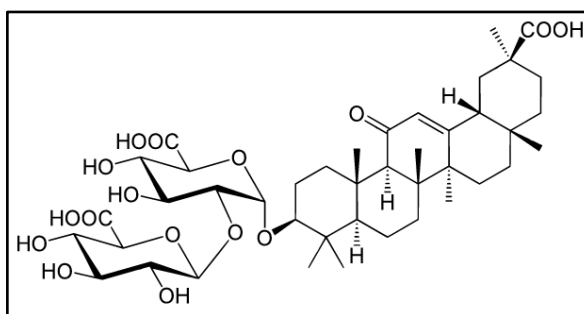


Figura 5 - Estrutura da glicirrizina, exemplo estrutural de saponina.

Fonte: Schenkel, Gosmann e Athayde (2004, p. 726)

Os compostos fenólicos possuem pelo menos um anel aromático em sua estrutura, sendo que um dos hidrogênios é substituído por uma hidroxila. Essa classe de compostos abrange as ligninas, os flavonóides e os taninos. As estruturas fenólicas são também encontradas em proteínas, alcaloides e terpenóides, sendo importantes para a coloração, odor e sabor de diversos vegetais. Efeitos bactericidas e antivirais têm sido relatados para esta classe de metabólitos secundários (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

Os flavonóides (Figura 6 a, b) pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e são importantes, em angiospermas, na sinalização entre os organismos e na proteção contra os raios UV (MALACRIDA; MOTTA, 2005). Possuem emprego terapêutico, propriedades antitumorais, antimicrobianas e antivirais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

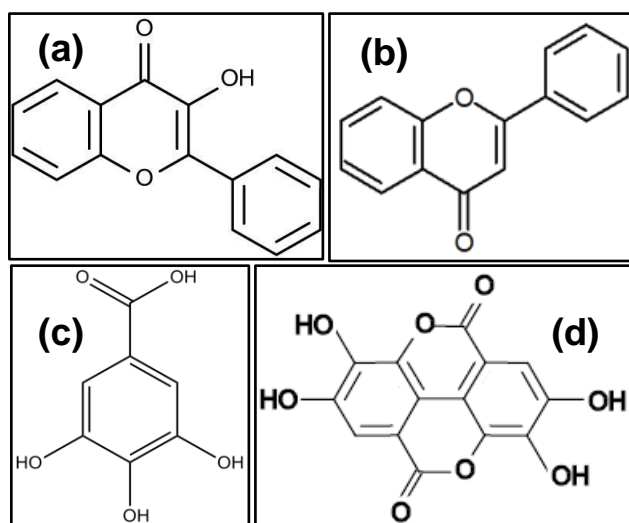


Figura 6 - Estrutura genérica de alguns compostos fenólicos. Os flavonóides: a) flavonol, b) flavona. Os taninos: c) ácido gálico, d) ácido elágico
Fonte: Liu (2004, p.3481)

Os taninos (Figura 6 c, d) são substâncias fenólicas naturalmente solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos insolúveis e precipitar alcalóides e proteínas. São responsáveis pela adstringência de frutos e, devido à capacidade de complexação com proteínas, atuam no controle de insetos, fungos e bactérias (SANTOS; MELLO, 2004).

Os alcalóides são compostos cíclicos nitrogenados (Figura 7). São pouco comuns entre os organismos vivos, encontrados em espécies de angiospermas e apresentam propriedades farmacológicas. Esta classe de compostos é conhecida pelos seus efeitos sobre o sistema nervoso, além de apresentarem características tóxicas (BEZERRA, 2008). São amplamente utilizados na síntese de fármacos para efeitos anti-hipertensivos, antitumorais, antivirais, além de atuarem no tratamento da malária (HENRIQUES et al., 2004).

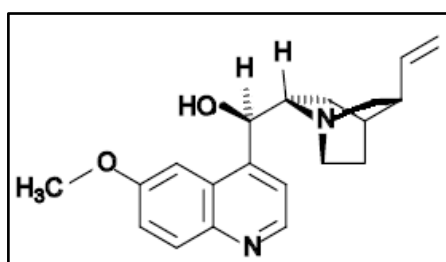


Figura 7 - Estrutura da quinina, um exemplo estrutural de alcalóide
Fonte: Henriques et al. (2004, p. 776)

A grande complexidade e diversidade de compostos fitoquímicos com potenciais atividades biológicas corroboram para a busca de atividade inibitória de extratos vegetais no crescimento de cianobactérias, uma vez que muitos desses compostos apresentam atividade antimicrobiana. A caracterização química dos extratos vegetais ativos é um dos desafios para a elucidação das propriedades atribuídas a esses potenciais aleloquímicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os experimentos foram realizados com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, proveniente de um inóculo da cepa BB005, fornecida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos em março de 2011. Este organismo foi isolado do reservatório de Barra Bonita em São Paulo sendo proveniente de florações tóxicas.

Para o cultivo do inóculo em laboratório, foram adotadas algumas medidas de segurança devido à possível toxicidade da cepa. Os experimentos foram realizados em local isolado e de acesso restrito, mediante a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI's) como máscaras, luvas e jaleco. Durante as análises os frascos contendo cultivos foram abertos, para retiradas de amostras, sempre próximos à chama do bico de Bunsen ou, em alguns casos, dentro de câmara de fluxo laminar para manter o inóculo sem contaminações e evitar a inalação de células pelo analista e pelos demais usuários do laboratório.

O meio de cultura líquido ASM-1 foi utilizado para o cultivo da *M. aeruginosa* (GORHAM et al., 1964) e sua composição está descrita na Tabela 1.

De forma a manter a integridade do inóculo e a manutenção da cepa em laboratório, foram realizados repiques mensais em tubos, contendo 15 mL do meio ASM-1 autoclavado, fechados com rolhas de algodão. O tempo para atingir a esterilidade do meio de cultura foi de 30 minutos a 121°C (AZEVEDO; SANT'ANNA, 2003).

Os cultivos, gerados ao longo dos experimentos, foram esterilizados ao final dos testes, armazenados em recipientes plásticos e descartados como resíduos tóxicos.

Tabela 1 - Composição das soluções-estoque e o volume utilizado para o preparo do meio de cultura ASM-1

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

Fonte: Oliveira (2009, p. 58)

As condições de cultivo em laboratório da cepa BB005 foram baseadas em dois estudos, sendo o primeiro deles realizado por Soares, Magalhães e Azevedo (2004) em que o fotoperíodo, a intensidade luminosa e a temperatura foram respectivamente 12 h, 22 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 23 ± 2 °C. No segundo, Jiang et al. (2008) utilizou as condições de 12 h, 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 22 ± 1 °C. Buscou-se reproduzir tais variáveis de forma que os inóculos e culturas para teste foram realizados em ambiente com fotoperíodo de 12h (regulado por temporizador analógico), intensidade luminosa de 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (medida por luxímetro digital, marca *Instrutherm* modelo *LDR-380*) e ajuste de temperatura com aquecedor elétrico de ambiente nos períodos mais frios, de forma a mantê-la entre 23 e 27 °C.

Para volumes de cultivo maiores que 100 mL, utilizou-se sistema de aeração contínuo, de forma a proporcionar uma melhor distribuição dos nutrientes e diminuir a formação de colônias (OLIVEIRA, 2009).

O fornecimento de ar aos cultivos foi realizado através de bombas de aquário sem filtração, pois o elevado número de frascos durante os testes e a reduzida potência das bombas inviabilizou este processo de esterilização. As saídas de ar foram calibradas com o auxílio de divisores de fluxo de forma que a quantidade de

bolhas fosse semelhante entre as réplicas do estudo. A uniformidade entre os testes foi avaliada com base nos desvios obtidos nas contagens.

Os aspectos morfológicos, as possíveis contaminações e a presença de mucilagem foram verificados através de visualizações em microscópio ótico (marca *Olympus*, modelo *BX51*) de lâminas a fresco, coradas pela coloração de Gram e de nanquim respectivamente.

4.2 PARÂMETROS ANALÍTICOS

Para a realização dos testes cinéticos e de inibição da *M. aeruginosa*, foram utilizados como parâmetros de crescimento celular a contagem do número de células, fluorescência da amostra e concentração de pigmentos celulares. As análises foram realizadas conforme descrito nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3.

4.2.1 Determinação da concentração celular por contagem

As contagens celulares foram realizadas com o auxílio de um hemacitômetro de Neubauer (profundidade 0,100 mm), com leitura no sentido anti-horário dos campos (Figura 8) com a finalidade apenas de padronizar o processo de análise.

Baseado nas dimensões da câmara de Neubauer (Figura 8), para estimar o valor de concentração celular foi utilizada a Equação 1 ou 2.

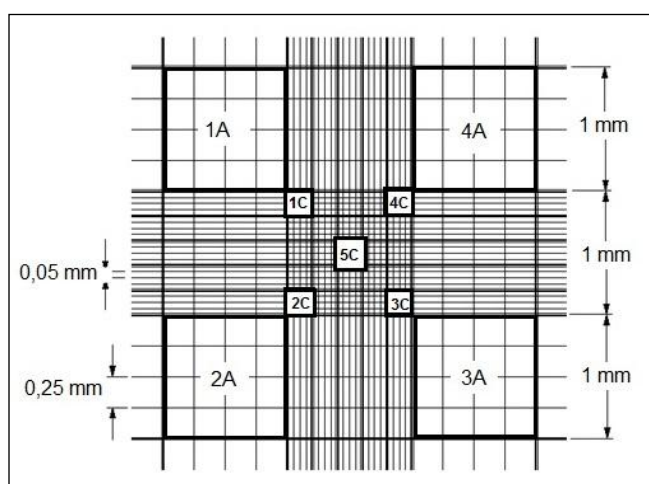


Figura 8 - Representação dos campos de contagem da câmara de Neubauer, suas dimensões e sentidos de contagem.

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

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

Sendo:

y = concentração celular em células.mL⁻¹;

X_A = média das contagens entre os 4 campos indicados pela letra A;

X_C = média das contagens entre os 5 campos indicados pela letra C;

FD = fator utilizado caso alguma diluição fosse realizada.

A escolha do campo de contagem e da sua respectiva equação, ficou condicionada à concentração celular. Para suspensões mais diluídas de células, foram utilizados os campos indicados pela letra A e calculada a média entre os mesmos (Equação 1). Para amostras mais concentradas, foram contados os campos indicados pela letra C e, da mesma forma, calculada a média entre estes (Equação 2).

De forma a reduzir erros, resultantes da sobreposição de células e da formação de colônias, além da contagem de amostras *in natura*, optou-se por avaliar a aplicação do método de digestão da mucilagem para desagregação de colônias. Para a comparação dos métodos de contagem, foram preparadas diluições de inóculo a partir de cultivos contendo 10⁷ células. mL⁻¹, em meio de cultura ASM-1, obtendo assim as concentrações celulares de 10⁶, 10⁵ e 10⁴, que constituíram o intervalo de concentração celular mais utilizado durante os experimentos. Foram então retiradas alíquotas, em triplicata, para a contagem *in natura* e para a contagem após digestão.

A digestão foi realizada de acordo com o método proposto por Reynolds e Jaworski (1978), utilizando solução de NaOH (1,0 M) na proporção de 20 µL para cada 2 mL de amostra, devendo esta permanecer em estufa a 70 °C por 40 minutos. Todas as amostras foram contadas, em microscópio óptico (marca *Olympus*, modelo *BX51*) em um aumento de 400 vezes, e a precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV) entre as medidas.

4.2.2 Determinação da fluorescência

Para a utilização da fluorescência como parâmetro de análise da concentração celular, relacionou-se a concentração de suspensões celulares (células.mL⁻¹) com a intensidade de sinal obtida em espectrofotômetro de fluorescência (marca *Varian*, modelo *Cary Eclipse*).

As leituras foram realizadas em cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico, 4 faces polidas e capacidade para 3,5 mL de amostra.

Para estabelecer a correlação entre a fluorescência e a contagem celular, obteve-se inicialmente uma suspensão contendo 10⁷ células.mL⁻¹ nas mesmas condições descritas no item 4.1, e procedeu-se a obtenção de espectros de varredura (excitação e emissão) de forma a verificar quais comprimentos de onda são adequados para estimar a concentração celular. A faixa do espectro testada foi aquela entre 500 e 700 nm, em que os pigmentos de cianobactérias, possivelmente, apresentam atividade de fluorescência (BODEMER, 2004).

Após a verificação dos comprimentos de onda adequados à análise de fluorescência, o cultivo foi diluído, utilizando o meio de cultura ASM-1, de forma a obter as concentrações de 10⁶, 10⁵ e 10⁴ células.mL⁻¹. Essas diluições, preparadas em triplicata (9 amostras), foram analisadas em espectrofotômetro de fluorescência nos comprimentos de onda selecionados e os valores de intensidade de sinal foram, então, relacionados à concentração celular. Através da análise de regressão linear avaliou-se a viabilidade de utilização deste parâmetro como medida indireta da biomassa de *M. aeruginosa*.

4.2.3 Determinação dos pigmentos celulares

Foram obtidas as mesmas diluições, descritas no item 4.2.2, para a verificação de linearidade das metodologias de determinação dos pigmentos celulares.

Amostras de 6 mL, em triplicata, de cada diluição foram centrifugadas a 10500rpm (ultracentrífuga marca *HT*, modelo *MCD 2000*) durante 4 minutos, condição obtida experimentalmente e que apresentou maior eficiência para sedimentação das células.

Para a análise de clorofila-*a* foi utilizada acetona como solvente e o tempo de extração do pigmento de acordo com o recomendado por Lichtenthaler e Wellburn (1983). Para isso o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado de células, foram adicionados 2 mL de acetona 80% (v/v). A mistura, após a homogeneização, permaneceu resfriada e na ausência de luz por um período de 24 h, para a extração dos pigmentos. Após este período, a amostra foi novamente homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro (marca *Varian*, modelo *Cary 50*) nos comprimentos de onda 663 e 646 nm. A concentração de clorofila-*a* foi calculada de acordo com a Equação 3 proposta pelo método.

$$\text{Clorofila-}a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 12,21.(A_{663}) - 2,81.(A_{646}) \quad (3)$$

O número de células, obtido através de contagem em câmara de Neubauer, foi relacionado com a concentração de clorofila-*a* em mg.L⁻¹ através de regressão linear para a calibração do método.

Para a determinação de ficobiliproteínas totais, foi utilizado o método proposto por Bennett e Bogorad (1973). Alíquotas de 6 mL, em triplicata, das diluições de células foram centrifugadas de forma análoga à descrita anteriormente, e ao precipitado obtido foram adicionados 2mL de solução tamponada de fosfato salino (NaH₂PO₄ 0,01 M e NaCl 0,15 M, em pH 7). Essa mistura foi congelada e descongelada 8 vezes, para o rompimento das células e liberação dos pigmentos em solução. Novamente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 562, 615 e 652 nm.

As equações 4 a 7 relacionam a absorvância com a concentração de ficobiliproteínas (em mg.L⁻¹):

$$PC = [(A_{615}) - 0,474.(A_{652})] / 5,32 \quad (4)$$

$$APC = [(A_{652}) - 0,208.(A_{615})] / 5,09 \quad (5)$$

$$PE = [(A_{562}) - 2,41.(PC) - 0,849.(APC)] / 9,62 \quad (6)$$

$$PB = (PC) + (PE) + (APC) \quad (7)$$

Sendo:

PC = concentração de ficocianina;

APC = concentração de aloficocianina;

PE = concentração de ficoeritrina;

PB = concentração de ficobiliproteínas

O método foi também calibrado correlacionando as concentrações celulares, obtidas por contagem, com a concentração de ficobiliproteínas em mg.L^{-1} através de regressão linear.

A escolha dentre as metodologias, ficou condicionada àquela cujo valor de linearidade e correlação fosse superior.

4.3 VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Para o estudo da cinética de crescimento da cianobactéria *M. aeruginosa* foram realizados cultivos (triplicata) em *erlenmeyers* contendo 250 mL do meio de cultura, utilizando dois volumes de inóculo inicial, em dois experimentos diferentes. Nesta etapa foram avaliadas as diferenças nas curvas de crescimento entre cultivos de menor e maior concentração celular inicial, de forma a selecionar taxas de inoculação mais adequadas. Todos os inóculos que foram utilizados para a realização dos experimentos apresentavam-se na fase exponencial de crescimento celular.

O primeiro teste foi realizado, no período entre junho e julho de 2011, utilizando a concentração inicial para cada frasco de $2,37 (\pm 0,20) \cdot 10^3$ células.mL⁻¹.

No segundo teste, realizado entre julho e agosto de 2011, os frascos foram inoculados com uma suspensão de células, de forma que a concentração inicial foi de $5,89 (\pm 0,77) \cdot 10^4$ células.mL⁻¹.

O crescimento celular foi verificado durante 50 dias, utilizando o método de contagem celular *in natura* conforme descrito no item 4.2.1, em intervalos médios de 48 h.

4.4 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM MEIO ASM-1

Com o intuito de obter um maior número de células em intervalos de tempo menores, algumas condições nutricionais do meio de cultura líquido ASM-1 foram otimizadas utilizando planejamento fatorial do tipo 2⁴.

A obtenção do desenho experimental, da matriz amostral e de parte das interpretações, foram realizadas com o programa *STATGRAPHICS Centurion XV*. Os dados foram tabulados e analisados com o auxílio do programa *Microsoft Excel 2007*.

As concentrações de nitrogênio, fósforo e ferro do meio de cultura ASM-1 foram triplicadas (no nível superior) de forma a verificar a possível limitação por algum desses nutrientes (Tabela 2). O efeito do pH foi também avaliado, de forma a verificar sua influência sobre o crescimento celular em meios neutros e básicos (JIANG et al., 2008).

Tabela 2 - Níveis experimentais inferior (-) e superior (+) para as variáveis utilizadas na otimização do cultivo da cianobactéria

Variável	(-)	(+)
pH	7	10
Nitrogênio (NaNO ₃)	170 mg.L ⁻¹	510 mg.L ⁻¹
Fósforo (KH ₂ PO ₄)	17,4 mg.L ⁻¹	52,2 mg.L ⁻¹
Ferro (FeCl ₂)	1,08 mg.L ⁻¹	3,24 mg.L ⁻¹

As quatro variáveis experimentais resultaram em 16 condições diferentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Desenho experimental do sistema de cultivo para as variáveis pH, N, P e Fe

Condição	pH	Nitrogênio	Fósforo	Ferro
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1

A verificação das melhores condições de crescimento foi avaliada, inicialmente, em 48 tubos de ensaio contendo 15 mL dos meios a serem testados, em triplicata (Figura 9 a).

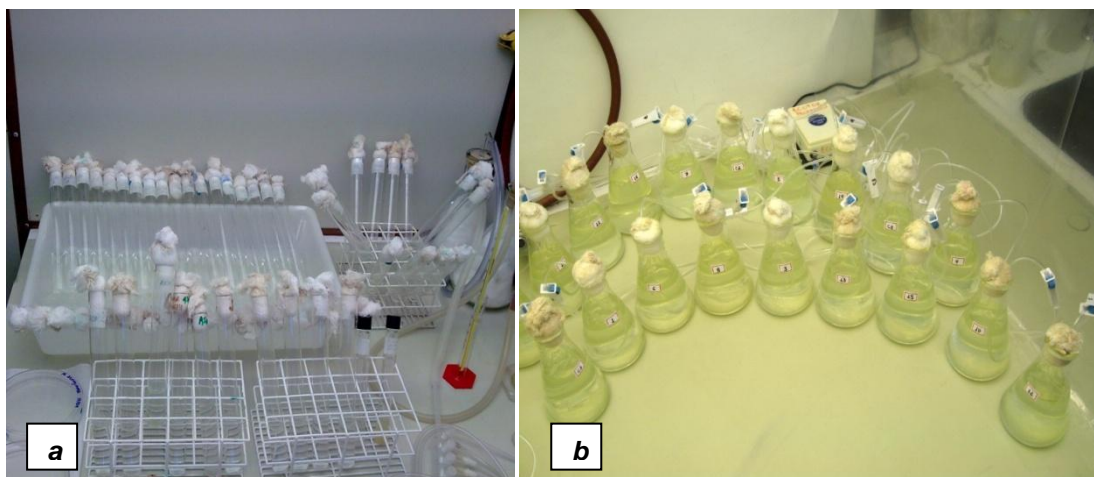


Figura 9 - Experimento de otimização do cultivo de *M. aeruginosa*. a) planejamento com tubos em triplicata, b) planejamento simples com *erlenmeyers*.

Nos tubos distribuídos aleatoriamente, o estudo preliminar foi acompanhado através da contagem do número de células, realizada a cada 3 dias, por um período de 3 semanas aproximadamente. A concentração celular inicial média em cada tubo foi de $2,007 (\pm 0,031) \cdot 10^5$ células.mL⁻¹.

Um segundo experimento do planejamento fatorial (Figura 9 b) foi realizado em 16 *erlenmeyers* utilizando 250 mL dos meios de cultura testados (Tabela 3). Nesta etapa, utilizou-se a aeração dos frascos inoculados com uma suspensão de células na fase exponencial de crescimento. A concentração inicial foi de $6,24 (\pm 0,22) \cdot 10^5$ células.mL⁻¹ em cada *erlenmeyer*. Os frascos teste foram distribuídos aleatoriamente através de sorteio. Foram retiradas alíquotas a cada 4 dias, por um período de 16 dias, para a determinação da concentração celular através de contagem do número de células (item 4.2.1) e concentração de pigmentos celulares (item 4.2.3). Este segundo experimento foi realizado em réplica única de forma a viabilizar a realização do maior número de parâmetros propostos e consequentemente favorecer a escolha das condições mais adequadas ao estudo.

Para o cálculo dos efeitos, nos dois experimentos, a resposta avaliada foi o crescimento celular (μ), obtido de acordo com a Equação 8 proposta por Guillard (1973), ao final do período monitorado.

$$\mu = [\log_2 (N - N_0)].(t - t_0)^{-1} \quad (8)$$

Sendo:

μ = taxa de crescimento;

N = número de células ao final do período analisado;

N_0 = número de células no início do período analisado;

t = número de dias ao final do período analisado;

t_0 = número de dias no início do período analisado.

A escolha do meio de cultura otimizado foi baseada em cultivos que apresentaram maior concentração celular e baixa formação de colônias.

O segundo experimento foi utilizado para avaliar a otimização nas mesmas condições dos experimentos de inibição, utilizando volumes maiores do meio de cultura.

4.5 PREPARO DOS EXTRATOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

As macrófitas aquáticas, utilizadas para a obtenção dos extratos, foram coletadas na região Metropolitana de Curitiba, nas cavas do rio Iguaçu (25°48'S; 49°13'), em outubro de 2011.

As sete espécies utilizadas para a obtenção dos extratos, identificadas através de bibliografia especializada, foram *Eichornia azurea* (Sw.) Kunth, *Eleocharis cf. acutangula* (Roxb.) Steud., *Ludwigia cf. peruviana* (L.) Hara, *Myriophyllum cf. aquaticum* (Vell.) Verdc., *Pontederia cordata* L. var. *cordata*, *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schltl e *Typha domingensis* Pers.

As plantas amostradas foram transportadas para laboratório e lavadas em água corrente para a remoção de sujidades e, em seguida, foram secas em estufa a 33 °C por 15 dias para a remoção da umidade (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES,

2004). Após a secagem, o material foi pulverizado e peneirado para a padronização granulométrica.

4.5.1 Processos de extração

A extração dos princípios ativos ocorreu, inicialmente, pelo método de maceração por 48 h, conforme Figura 10.

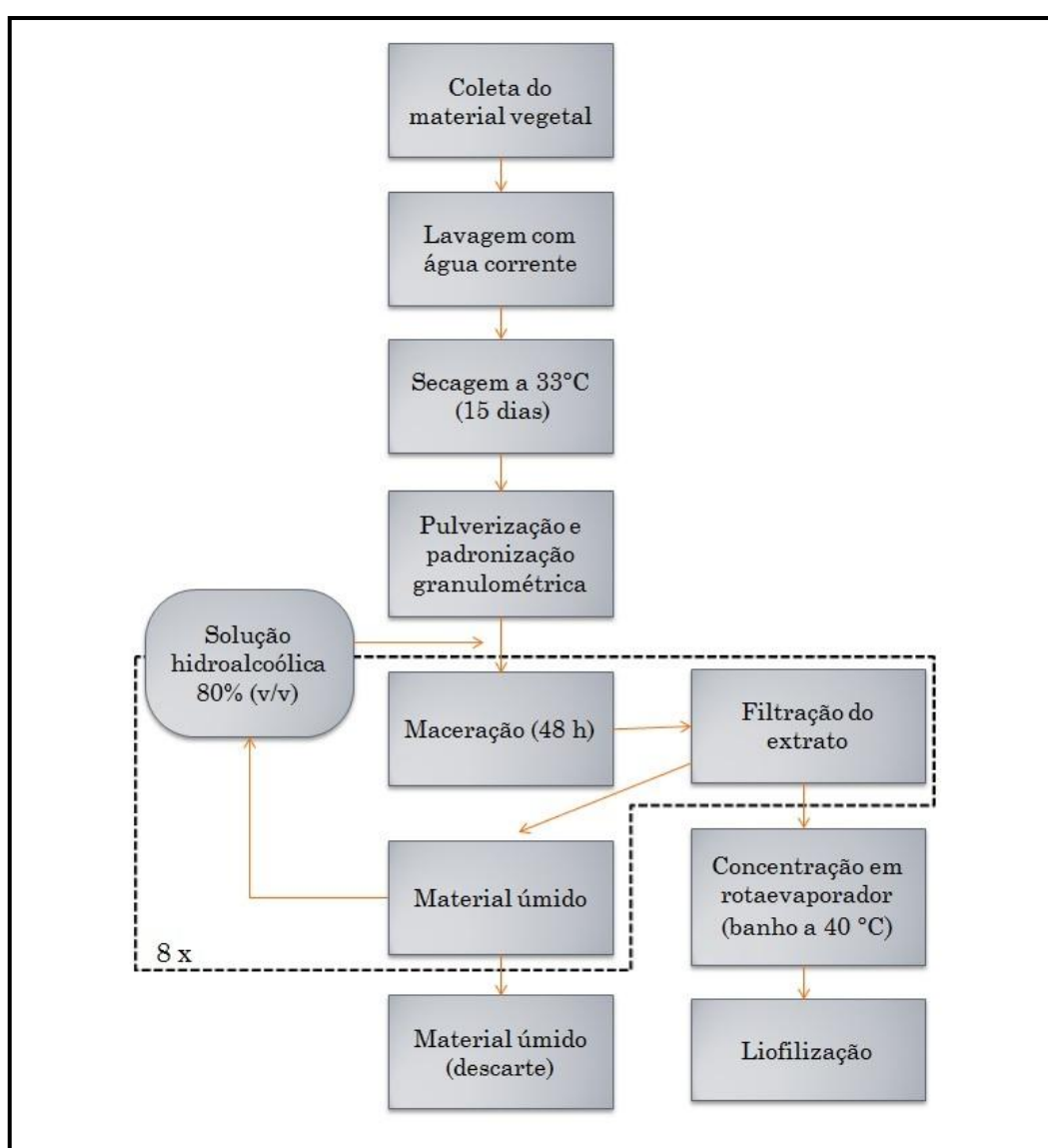


Figura 10 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas através do processo de maceração 48 h.

O material pulverizado de cada espécie vegetal foi pesado (em quantidades que variaram de acordo com a disponibilidade de material conforme a Tabela 4) e colocado em frascos de vidro limpos e secos, sendo adicionada solução hidroetanólica 80% (v/v), fechados e mantidos sob agitação constante por 48 h (agitador orbital marca *Fanem* modelo 255-B).

Após o período de maceração, o extrato líquido foi filtrado sob vácuo e o resíduo vegetal úmido foi remacerado, nas mesmas condições, repetidas vezes (oito extrações) para promover o máximo esgotamento dos constituintes ativos da amostra. Os extratos líquidos obtidos após as oito etapas de extração foram reunidos e evaporados a temperatura de 40°C em rotaevaporador (marca *Fisatom*, modelo 801) até a completa remoção do etanol (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

Tabela 4 - Quantidade inicial de vegetal pulverizado e o método utilizado para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos.

Extratos	Massa inicial de plantas pulverizadas (g)	Método de extração
<i>Eichhornia azurea</i>	40	ultrassom
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	25	ultrassom
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	40	ultrassom
<i>Myriophyllum cf. aquaticum</i> (partes aéreas)	50	maceração 48 h
<i>Myriophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	80	maceração 48 h
<i>Pontederia cordata</i>	20	ultrassom
<i>Sagittaria montevidensis</i>	30	ultrassom
<i>Typha domingensis</i>	30	ultrassom

Com o intuito de otimizar o processo de extração, as demais amostras vegetais foram extraídas empregando o banho ultrassônico ao invés da maceração por 48 h.

As amostras vegetais secas e pulverizadas foram, da mesma maneira, pesadas e submetidas a 3 ciclos de extração (45 min cada) com solução hidroetanólica 80% (v/v) em ultrassom (VICTÓRIO; LAGE; KUSTER, 2010). Assim como nos extratos obtidos por maceração, os extratos filtrados foram reunidos e rotaevaporados, para a remoção do etanol.

Os extratos obtidos foram congelados, liofilizados (liofilizador marca *Liotop*, modelo *L101*) e armazenados sob refrigeração (-20 °C), até o momento do preparo dos testes de inibição.

4.5.2 Preparo dos extratos para os testes

Os extratos liofilizados foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 3:1 (solvente:extrato) e diluições foram preparadas, em meio ASM-1 otimizado, nas concentrações-teste que, nos experimentos preliminares com as raízes de *M. cf. aquaticum*, foram 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg.L⁻¹.

4.6 TESTES DE INIBIÇÃO

Para os testes de inibição utilizou-se o meio de cultura otimizado (item 4.4). O cultivo inicial foi realizado com 5% (v/v) de inóculo (em fase exponencial de crescimento celular) de forma que a concentração inicial, verificada através de contagem em câmara de Neubauer, foi de 10⁵ células.mL⁻¹. A Figura 11 apresenta esquematicamente o procedimento experimental adotado durante os testes de inibição com os extratos vegetais.

O cultivo celular inicial foi mantido nas condições descritas no item 4.1, até que a cultura atingisse a concentração de 10⁶ células.mL⁻¹. A suspensão de células foi, então, dividida assepticamente em alíquotas de 150 mL (em *erlenmeyers* de 250 mL) para a aplicação dos extratos de macrófita, nas concentrações (em triplicata) mencionadas no item 4.5.2. Para a utilização dos cultivos os frascos foram previamente homogeneizados.

Os frascos-teste foram montados e autoclavados, de forma a permitir a retirada asséptica de amostras periodicamente, como ilustra a Figura 12. As alíquotas, contendo as concentrações de extrato a serem testadas bem como os controles, foram mantidas sob as mesmas condições do cultivo inicial.

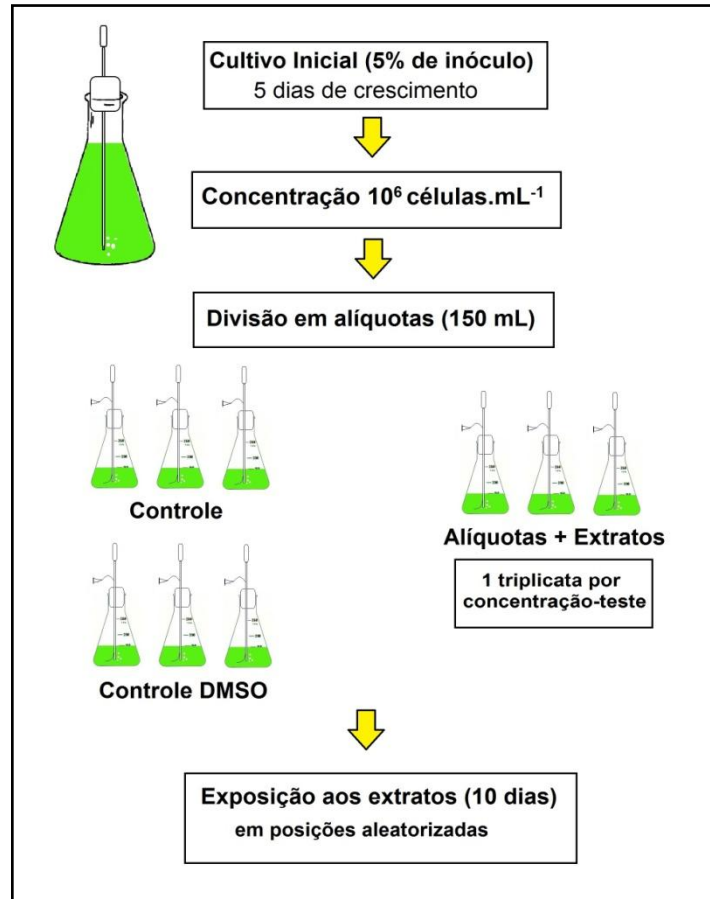


Figura 11 - Desenho esquemático do procedimento experimental adotado durante os testes de inibição.

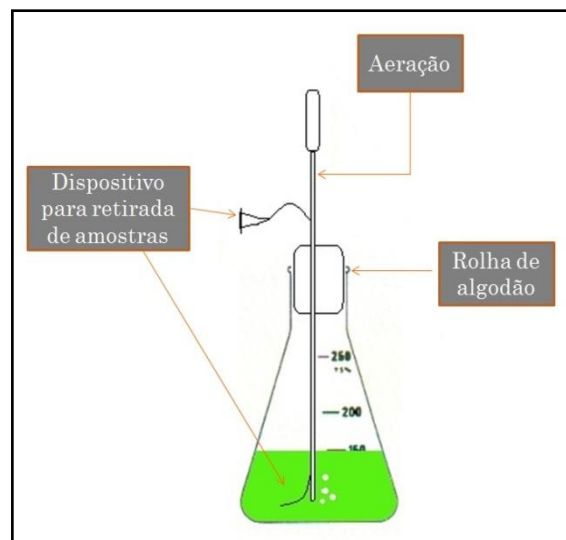


Figura 12 - Esquema de montagem do frasco de cultivo, para os testes de inibição.

O teste foi realizado com 2 controles, ambos em triplicata, sendo um com adição de DMSO - para avaliar possíveis efeitos inibitórios desse solvente sobre o crescimento celular - e o segundo sem adição do solvente, para monitorar o crescimento e viabilidade celular (Figura 11). O controle de dimetilsulfóxido foi preparado à partir de uma solução contendo 1,5 mL de DMSO aferido para 10 mL em balão volumétrico com o meio de cultura ASM-1, o mesmo utilizado nos testes de inibição. Foram adicionados 1,5 mL desta solução aos cultivos, que foi o maior volume necessário das soluções de extrato para a obtenção das concentrações teste.

De forma a aleatorizar o experimento e diminuir possíveis tendenciamentos, as posições dos frascos sobre a bancada foram numeradas e sorteadas no início dos testes com cada extrato obtido.

O acompanhamento do efeito inibitório sobre o crescimento celular foi investigado através de retiradas de amostras, a cada 48 h e durante 10 dias, de cada frasco teste, para a verificação do crescimento celular através de contagem (item 4.2.1) e da fluorescência (item 4.2.2).

A taxa de inibição foi calculada, de acordo com a Equação 9 proposta por Cheng et al. (2008), para os cultivos contendo as concentrações de extrato mais efetivas na inibição celular.

$$TI = [1 - (N \cdot N_0^{-1})] \cdot 100 \quad (9)$$

Sendo:

TI = taxa de inibição;

N = concentração celular (em células.mL⁻¹) no recipiente teste, após 10 dias de exposição aos extratos;

N₀ = concentração celular (em células.mL⁻¹) no recipiente controle, após 10 dias de cultivo.

A concentração de extrato que apresentou maiores efeitos inibitórios foi testada em novos cultivos de *M. aeruginosa* utilizando o mesmo método descrito para os testes de inibição. Os cultivos nesta etapa foram mantidos nas mesmas condições de luminosidade e temperatura por 10 dias e quantificados de acordo com o item 4.2.1 ao final do período testado. Este novo experimento foi realizado de

maneira a viabilizar a verificação dos efeitos bacteriostáticos e bactericidas dos extratos, bem como da concentração de microcistinas presentes nestes cultivos expostos (item 4.7).

Os efeitos bacteriostáticos e bactericidas foram avaliados com base em reinoculações dos cultivos ao final do experimento, em tubos de ensaio contendo meio de cultura estéril na proporção de 1 mL de amostra para 9 mL do meio ASM-1 otimizado, cuja determinação do número de células.mL⁻¹ foi realizada após 10 dias.

As possíveis diferenças nas concentrações celulares, resultantes da exposição aos extratos hidroalcoólicos, foram avaliadas através da análise de variância para medidas repetidas (ANOVA *repeated*), de maneira a verificar as variações entre os tratamentos utilizados ao longo das amostragens. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A tabulação e as interpretações dos resultados foram realizadas com o programa STATISTICA® (versão 6.0, StatSoft).

4.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS

As análises de microcistinas foram realizadas através da utilização de testes semi-quantitativos comerciais (Marca *Envirologix*), com leitura de absorbância em espectrofotômetro (marca *Varian*, modelo *Cary 50*) no comprimento de onda 450 nm. As leituras foram realizadas em cubeta de acrílico com 10 mm de caminho óptico, 2 faces polidas e volume útil para 1 mL de amostra.

A calibração deste método foi feita a partir dos padrões disponíveis no produto, nas concentrações de 0,5 e 3,0 ppb de microcistina-LR.

De forma a obter pontos intermediários da regressão linear e aumentar a confiabilidade do método, os padrões foram diluídos na proporção de 1:1 (v/v) com água ultrapura e analisados nas mesmas condições.

A análise da concentração de microcistina-LR foi realizada nos cultivos contendo as concentrações de extrato mais efetivas na inibição celular (sem filtragem das amostras) de forma a melhor verificar o efeito dos compostos fitoquímicos sobre a produção de microcistinas. Para estimar a produção da toxina, a análise foi também realizada no cultivo inicial, contendo 10⁶ células.mL⁻¹ obtido de acordo com o item 4.6.

4.8 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A presença e a variedade de aleloquímicos, presentes nos extratos hidoalcoólicos produzidos, foram avaliados de acordo com as principais classes de compostos fitoquímicos. Inicialmente 200 mg de cada extrato permaneceram em dessecador sob vácuo, para assegurar a ausência de água nas amostras. Os frascos contendo o material foram também envolvidos em papel alumínio de forma a evitar a fotodegradação.

As análises qualitativas foram realizadas de acordo com o proposto por Matos (2009) e são descritas nos itens 4.8.1 - 4.8.4. A análise quantitativa de compostos fenólicos, descrita no item 4.8.5 foi proposta por Sousa et al. (2007).

4.8.1 Esteróides e triterpenos

Foram pesados, em tubos de ensaio, 5 mg de cada extrato e a eles adicionados 1 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente em agitador para tubos tipo vortex (marca *Biomixer* modelo *QL-901*) e a porção líquida separada. Este processo foi repetido três vezes para cada amostra reunindo, no mesmo tubo, as soluções clorofórmicas de um mesmo extrato.

As soluções foram então filtradas com o auxílio de um funil contendo uma pequena porção de algodão e 200 mg de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). À solução clorofórmica obtida ao final, foram adicionados 1 mL de anidrido acético (vertendo cuidadosamente o líquido pelas paredes do tubo) e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

De acordo com o método, dependendo da classe de compostos presentes na amostra, observa-se o rápido desenvolvimento de cores, de maneira que ao final da análise a coloração azul evanescente, seguida de verde permanente, indica a presença de esteróides livres e a coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.8.2 Saponinas

Para a verificação da presença de saponinas nas amostras, foi utilizado o resíduo insolúvel gerado ao final da análise de esteróides e triterpenos (item 4.8.1), que foi dissolvido em 10 mL de água ultrapura em um tubo de ensaio.

A mistura foi agitada vigorosamente de forma manual por 3 minutos. A presença de saponinas foi evidenciada através da formação de espuma abundante e persistente por até 5 minutos.

Para confirmar a presença destes compostos foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) em cada tubo e estes foram aquecidos em banho-maria por 30 minutos. Ao final, após atingirem a temperatura ambiente, as soluções resultantes foram neutralizadas e agitadas novamente por 1 minuto. A presença de precipitado e a não formação de espuma, quando as soluções finais são agitadas, confirma a presença de saponinas nas amostras.

4.8.3 Taninos e fenóis

Com o auxílio do agitador de tubos, foram dissolvidos 10 mg de extrato vegetal em 5 mL de água ultrapura. A solução foi filtrada em um funil contendo uma pequena porção de algodão e a ela adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico 1% (FeCl_3). Um teste em branco foi preparado nas mesmas condições utilizando 5 mL de água ultrapura e 3 gotas da mesma solução de cloreto férrico.

A coloração variável entre o azul e o vermelho, na solução final obtida, indica a presença de fenóis; precipitado escuro de tonalidade azul quando taninos pirogálicos (hidrolisáveis) estão presentes e verde, se há predomínio de taninos catequéticos.

4.8.4 Flavonóides

Com o auxílio do agitador de tubos foram dissolvidos 10 mg de extrato em 20 mL de água ultrapura e a mistura foi dividida em 3 tubos de ensaio. No primeiro, o pH foi acidificado para 3,0 com ácido clorídrico (HCl); o segundo alcalinizado para 8,5 com hidróxido de sódio (NaOH) e o terceiro alcalinizado para 11,0.

Dependendo da classe de compostos, presentes na amostra, a solução adquire colorações diferentes quando o pH é alterado, de forma que a interpretação do resultado é realizada de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Coloração, resultante da mudança nos valores de pH, para cada classe de flavonóides

Classe dos constituintes	Coloração		
	Ácido (pH 3,0)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11,0)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas			Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha		Vermelho púrpura
Flavonóis			Vermelho alaranjado

Fonte: adaptado de Matos (2009)

4.8.5 Fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais, nos extratos hidroalcoólicos, foi utilizado o método quantitativo proposto por Sousa et al. (2007).

Foram pesados 10 mg de extrato, em seguida dissolvidos com 3 mL de metanol. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico e aferida para 10 mL com metanol.

Em um tubo de ensaio, uma alíquota de 100 μL da amostra dissolvida foi agitada com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min (em agitador de tubos). Após este período, 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 15%) foram adicionados à mistura que foi novamente agitada por 30 s. As amostras, após 2 h, foram analisadas em espectrofotômetro (em 750 nm) com o auxílio de uma cubeta de vidro (2 faces polidas e 10 mm de caminho óptico).

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg de EAG.g⁻¹ de extrato). Para isso as absorvâncias das amostras foram interpoladas contra uma curva de calibração construída com padrões (em triplicata) de ácido gálico, preparados com metanol, nas concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 mg.L⁻¹ nas mesmas condições utilizadas para as amostras.

4.9 ENSAIOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

A verificação da toxicidade dos extratos utilizando o organismo *Daphnia magna* foi realizada de acordo com o proposto pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 12713:2009).

Os extratos foram dissolvidos em 0,8 mL de DMSO e preparados nas mesmas concentrações utilizadas nos testes de inibição (item 4.6). As diluições necessárias para obter as concentrações teste foram realizadas, neste caso, com a água de diluição empregada em testes para *D. magna*.

As análises foram realizadas em quatro réplicas, com 10 organismos jovens (entre 2 e 26 h de idade) provenientes de fêmeas (matrizes) com idade de até 40 dias. O volume de água de diluição foi 20 mL em cada recipiente teste. Os experimentos foram mantidos a 20 °C em ausência de luz e a leitura dos resultados ocorreu após 48 h de exposição ao extrato.

Dois controles foram utilizados, ambos em quadruplicata, sendo um deles com adição de DMSO, para avaliar os possíveis efeitos desse solvente sobre a *D. magna*, e o segundo contendo apenas água de diluição, para monitorar a viabilidade dos organismos testados. O controle de dimetilsulfóxido foi preparado a partir de uma solução contendo 0,8 mL de DMSO aferido para 10 mL em balão volumétrico com a água de diluição, de mesma composição daquela utilizada nos testes de imobilidade. Foi adicionado 1 mL desta solução aos recipientes teste, que correspondeu ao maior volume utilizado, das soluções de extratos.

A interpretação dos resultados foi baseada na porcentagem de organismos que apresentaram imobilidade, após o período de exposição aos extratos, em relação aos controles.

A partir dos testes preliminares, foram analisadas concentrações de extrato intermediárias de maneira que fosse possível calcular os valores da concentração efetiva na imobilização dos organismos, a CE(50). Os valores de CE(50) foram obtidos com o auxílio do programa *Biostat 2008 Professional*, através da análise de probitos. A sensibilidade do organismo foi testada, em triplicata, utilizando o cloreto de potássio (KCl) como substância de referência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CIANOBACTÉRIA E CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

A caracterização estrutural e morfológica do organismo, bem como a adaptação das condições experimentais foram realizadas durante esta etapa do estudo. Tais características foram importantes para avaliar e buscar quais as melhores condições de cultivo para a cepa analisada.

Foi possível observar, através das colorações de Gram e de nanquim respectivamente, que a cepa BB005 da cianobactéria de estudo (*Microcystis aeruginosa*) apresenta formato arredondado e colônias pleomórficas (Figura 13 a), parede celular típica de células do tipo Gram-negativas (Figura 13 b) e a presença de mucilagem irregular sobre a colônia (Figura 13 c).

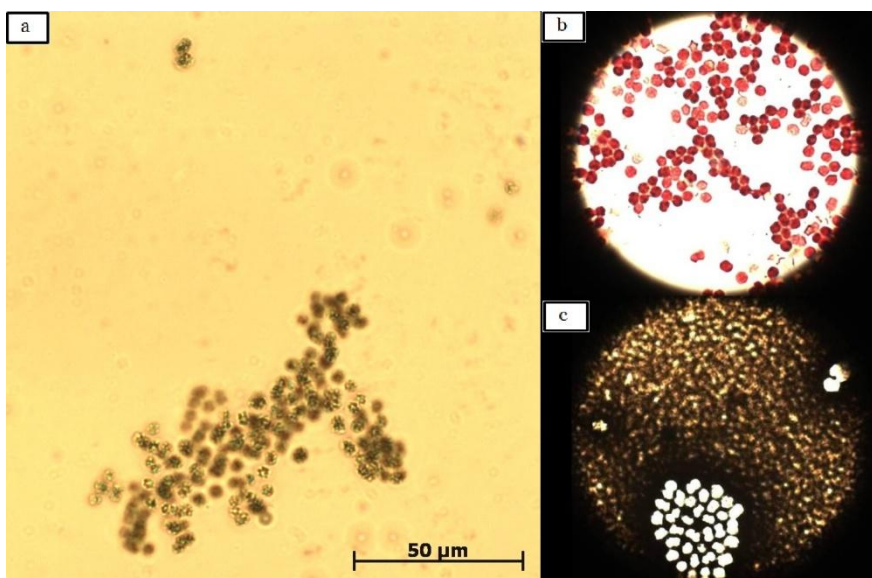


Figura 13 - Caracterização do inóculo de *M. aeruginosa*. a) Visualização a fresco em microscópio óptico (400x aumento) b) Coloração de Gram (aumento 1000x e óleo de imersão) c) Coloração com tinta nanquim (aumento 1000x e óleo de imersão).

Estas características confirmam aquelas previamente verificadas e descritas em estudos de identificação da espécie (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; SANT'ANNA et al., 2006).

5.1.1 Determinação da concentração celular por contagem

De forma a verificar os efeitos inibitórios, testados no estudo, a quantificação da biomassa foi realizada através de contagem direta ao microscópio, porém a sobreposição de células e a formação de colônias reduziu a confiabilidade do método. Por este motivo a técnica de digestão da mucilagem das células foi verificada objetivando a redução do erro experimental.

A Tabela 6 compara as densidades avaliadas com digestão da mucilagem e sem a aplicação desta metodologia.

Tabela 6 - Comparação entre os métodos de determinação da concentração celular (células.mL⁻¹) utilizados para as culturas de *M. aeruginosa*.

<i>In natura</i>			Com digestão		
Média experimental (células.mL ⁻¹)	Desvio padrão	Coeficiente de variação (CV%)	Média experimental (células.mL ⁻¹)	Desvio padrão	Coeficiente de variação (CV%)
1,92x10 ⁴	7,64x10 ³	39,85	4,42x10 ⁴	6,29x10 ³	14,24
1,34x10 ⁵	7,64x10 ³	5,69	1,51x10 ⁵	8,04x10 ³	5,33
1,41x10 ⁶	9,60x10 ⁴	6,82	1,34x10 ⁶	6,26x10 ³	0,47
1,46x10 ⁷	3,04x10 ⁵	2,08	1,18x10 ⁷	1,03x10 ⁵	0,87

Através das contagens realizadas, utilizando o método da digestão, foi possível observar que o coeficiente de variação entre os valores experimentais obtidos situou-se na faixa entre 0,87 a 14,24%, enquanto que a variação para as contagens sem digestão da mucilagem foi de 2,08 a 39,85%. A redução do erro experimental é, segundo Reynolds e Jaworski (1978), resultante da desagregação das colônias e de uma menor sobreposição de células.

Observa-se também que o aumento de concentração celular resulta em contagens mais precisas para os dois métodos, uma vez que os coeficientes de variação foram gradativamente menores.

Considerando o nível de dispersão, é possível afirmar que o método de digestão da mucilagem mostrou-se mais preciso na faixa de concentração celular utilizada nos estudos, além de facilitar as contagens, e foi por estes motivos, aplicado para estimar a concentração celular em amostras provenientes dos testes de inibição, em que a formação de colônias ocorreu de forma mais acentuada.

5.1.2 Determinação da fluorescência

A fluorescência foi utilizada para a determinação indireta da biomassa, presente nos cultivos de *M. aeruginosa*, de maneira a avaliar integradamente os efeitos inibitórios verificados no estudo. As vantagens da utilização do método foram o custo reduzido e a rápida obtenção dos resultados, devido à ausência de etapas de preparo das amostras.

De acordo com Bodemer (2004) a faixa para a detecção de cianobactérias por fluorescência, devido à presença de ficobiliproteínas, situa-se entre 620 e 670 nm. Estes valores foram também observados para a cepa em estudo.

A varredura das amostras, em espectrofotômetro de fluorescência, contendo células de *M. aeruginosa* evidenciou os comprimentos de onda de excitação e emissão de 632 e 654 nm respectivamente, como aqueles em que o sinal gerado pelo equipamento foram superiores.

As leituras da fluorescência, nos citados comprimentos de onda, apresentaram correlação significativa com a concentração celular ($r = 0,9967$; $p = 0,000001$), como pode ser verificado na Figura 14. Os testes indicaram também um coeficiente de determinação $r^2 = 0,9934$ entre as diluições obtidas.

Os testes iniciais indicaram a necessidade de se fazer diluições intermediárias para aumentar a confiabilidade do método. Utilizando um cultivo contendo 10^7 células.mL⁻¹ e o meio de cultura ASM-1, foram realizadas 10 diluições em triplicata (30 amostras) na proporção 1:1 e estas analisadas nas mesmas condições.

Os dados obtidos após as diluições intermediárias resultaram em coeficientes de correlação e de determinação elevados ($r = 0,9745$; $r^2 = 0,9496$; $p = 0,00001$) como pode ser verificado na Figura 15.

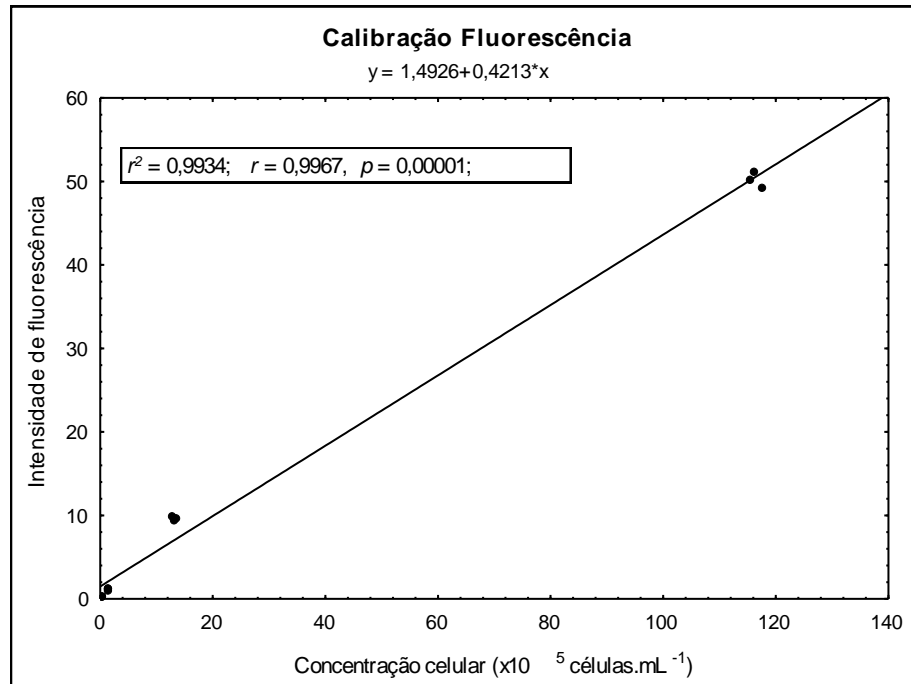


Figura 14 - Correlação entre a concentração celular e a intensidade de fluorescência para as diluições de *M. aeruginosa*

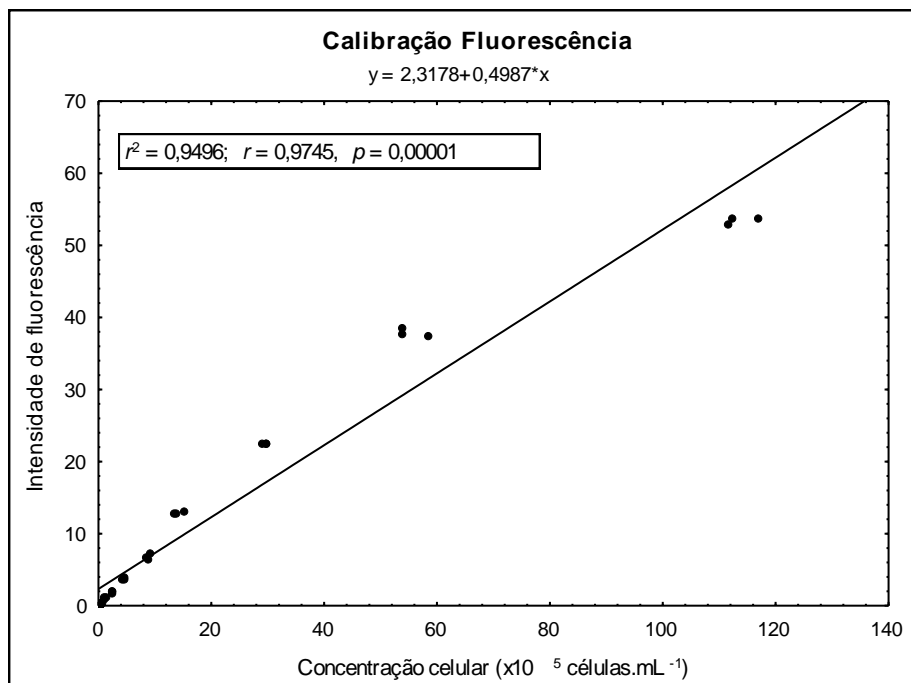


Figura 15 - Correlação entre a concentração celular e a intensidade de fluorescência para as diluições intermediárias de *M. aeruginosa*

A concentração celular máxima analisada durante a segunda calibração foi de $1,17 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹, cujo sinal gerado foi de 53,74 unidades de fluorescência. O sinal gerado pôde ser observado até a concentração celular mínima de $2,00 \cdot 10^4$ células.mL⁻¹ em que o sinal foi de 0,13 unidades de fluorescência.

Os valores elevados de correlação, mesmo quando diluições intermediárias foram analisadas, bem como a ausência de etapas de preparo das amostras, viabilizaram a utilização da fluorescência como método auxiliar na determinação da biomassa de *M. aeruginosa* para a otimização do meio de cultura (item 5.3) e durante os testes de inibição (item 5.5).

5.1.3 Determinação dos pigmentos celulares

Assim como a fluorescência, os pigmentos celulares foram utilizados para a determinação indireta da biomassa de forma a auxiliar nas estimativas dos efeitos inibitórios às células de *M. aeruginosa*.

Ao relacionar a clorofila-*a* com a concentração celular (Figura 16) foi possível verificar os valores de correlação entre estas variáveis ($r = 0,9539$, $p = 0,000002$), assim como o coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9099$), o que permite afirmar que o método apresentou menor precisão quando comparado a fluorescência (discutida no item 5.1.2), no intervalo de concentração analisado.

Da mesma maneira a concentração de ficobiliproteínas, quando relacionada com a concentração celular (Figura 17), apresentou reduzidos coeficientes de correlação e de determinação ($r = 0,9475$; $r^2 = 0,8978$; $p = 0,000003$).

A cianobactéria *M. aeruginosa* apresenta elevada capacidade de flutuação (WHITTON; POTTS, 2000; VISSER et al., 2005). Tal característica pode ter influenciado na eficiência de obtenção dos precipitados de células e conseqüentemente na determinação dos pigmentos.

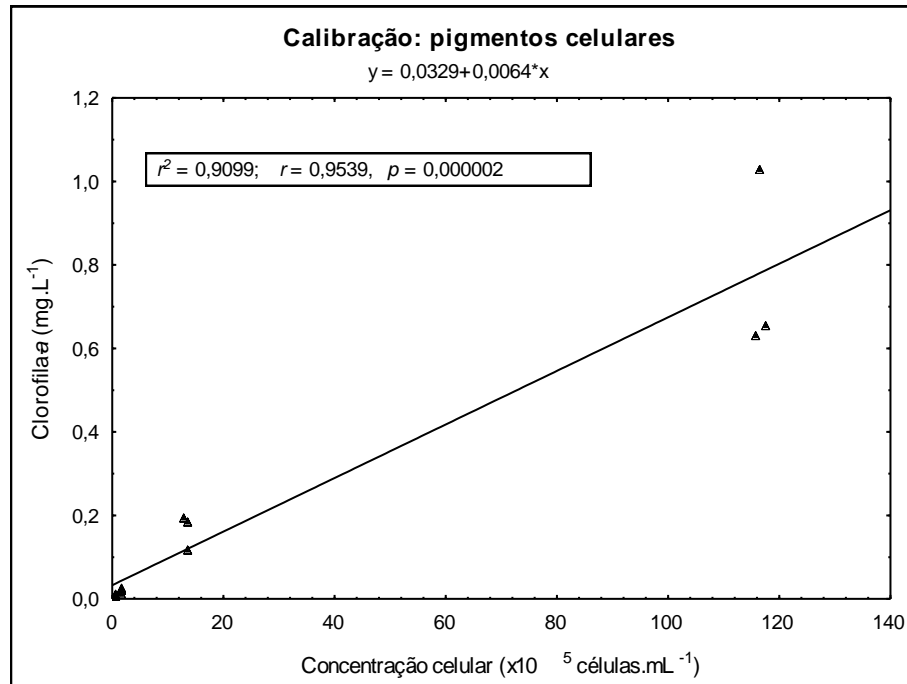


Figura 16 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de clorofila-a para as diluições de *M. aeruginosa*.

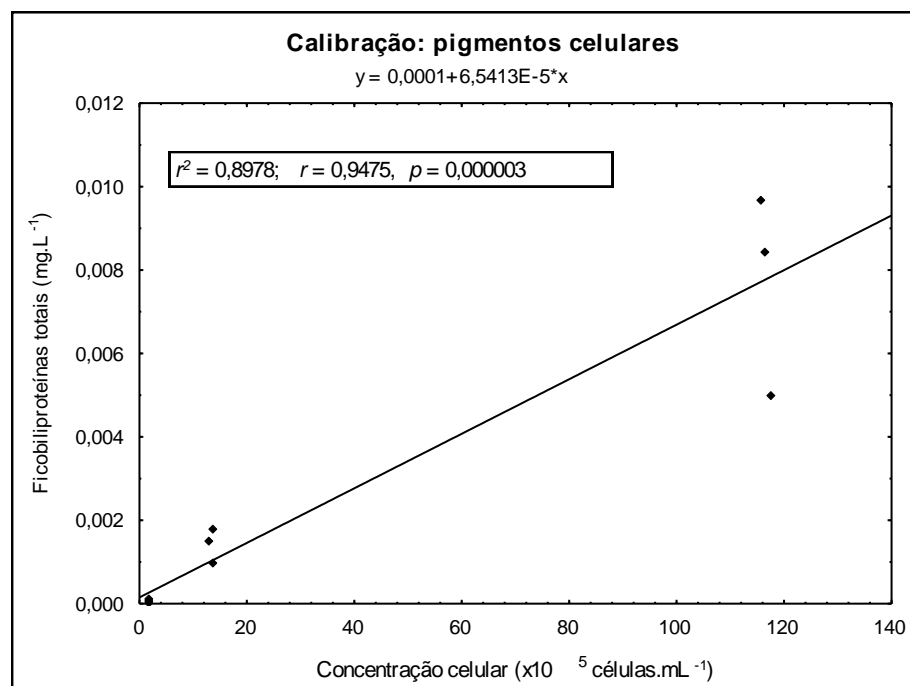


Figura 17 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de ficobiliproteínas totais para as diluições de *M. aeruginosa*.

O método de determinação da clorofila-a apresentou maiores coeficientes de correlação e de determinação em relação às ficobiliproteínas. Por este motivo e pela ineficiência de obtenção dos resultados de ficobiliproteínas, já que o preparo das

amostras neste caso é demorado, optou-se por utilizar apenas a concentração de clorofila-a como método auxiliar para estimar a biomassa de *M. aeruginosa* durante os experimentos. Para isso, de forma a aumentar a confiabilidade do método, foram realizadas diluições intermediárias para a obtenção de maiores dados da regressão.

Utilizando as mesmas diluições intermediárias obtidas na segunda calibração da fluorescência (item 5.1.2), obteve-se elevados coeficientes de correlação e de determinação para o método ($r = 0,9840$; $r^2 = 0,9683$; $p = 0,00001$), como pode ser verificado na Figura 18.

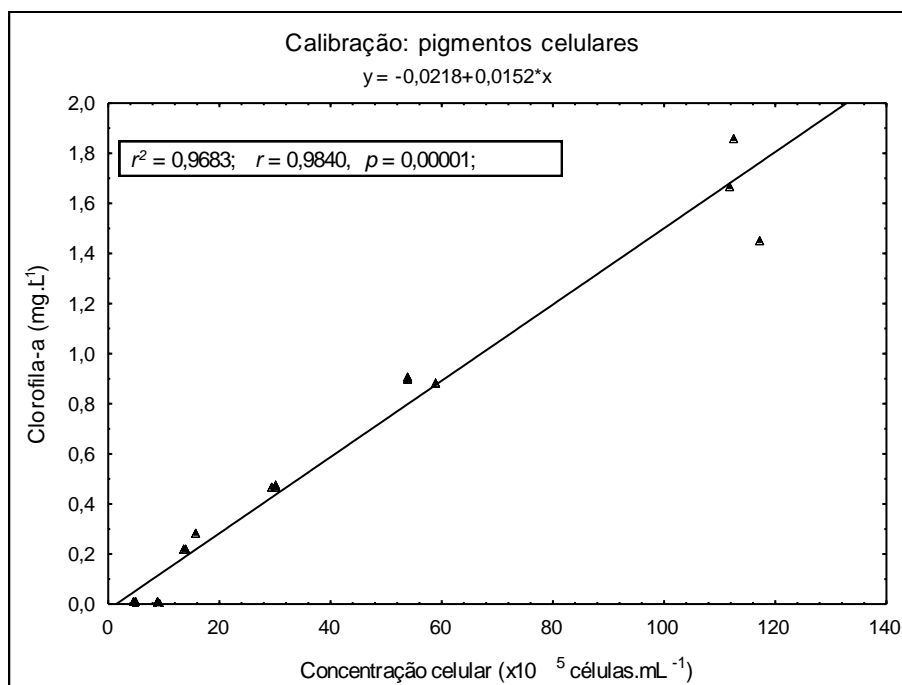


Figura 18 - Correlação entre a concentração celular e a concentração de clorofila-a para as diluições intermediárias de *M. aeruginosa*

A concentração celular máxima analisada durante a segunda calibração foi de $1,17 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹ contendo $1,86$ mg.L⁻¹ de clorofila-a. A detecção pôde ser observada até a concentração celular mínima de $4,43 \cdot 10^5$ células.mL⁻¹ que apresentou $0,015$ mg.L⁻¹ de clorofila-a.

Comparando os métodos da fluorescência (discutida no item 5.1.2) e da clorofila-a, pôde-se verificar que este apresentou maior correlação e linearidade, quando foram realizadas diluições intermediárias, porém o nível de detecção observado para o método da clorofila-a, bem como a necessidade de preparo da

amostra favoreceu a sua utilização apenas na otimização do meio de cultura (item 5.3).

5.2 VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A determinação da cinética de crescimento da cepa de *M. aeruginosa* foi realizada com o intuito de determinar as fases de crescimento do organismo para o planejamento e adaptação das condições experimentais.

No teste de menor taxa de inoculação, foi possível observar que a concentração celular máxima ocorreu em 32 dias de cultivo, em que a média das contagens resultou em $2,38 (\pm 0,054) \cdot 10^7$ células.mL⁻¹. Quando foi utilizada a maior taxa de inoculação, verificou-se a concentração celular máxima de $1,15 (\pm 0,18) \cdot 10^7$ células.mL⁻¹ com 41 dias de crescimento.

Na Figura 19 são apresentadas as curvas de crescimento obtidas com as duas inoculações testadas. A fase exponencial de crescimento, para as duas inoculações testadas, teve início, aproximadamente, após 7 dias. Com a menor taxa de inoculação, a fase exponencial foi de aproximadamente 15 dias, enquanto que com a maior taxa, foi de 7 dias.

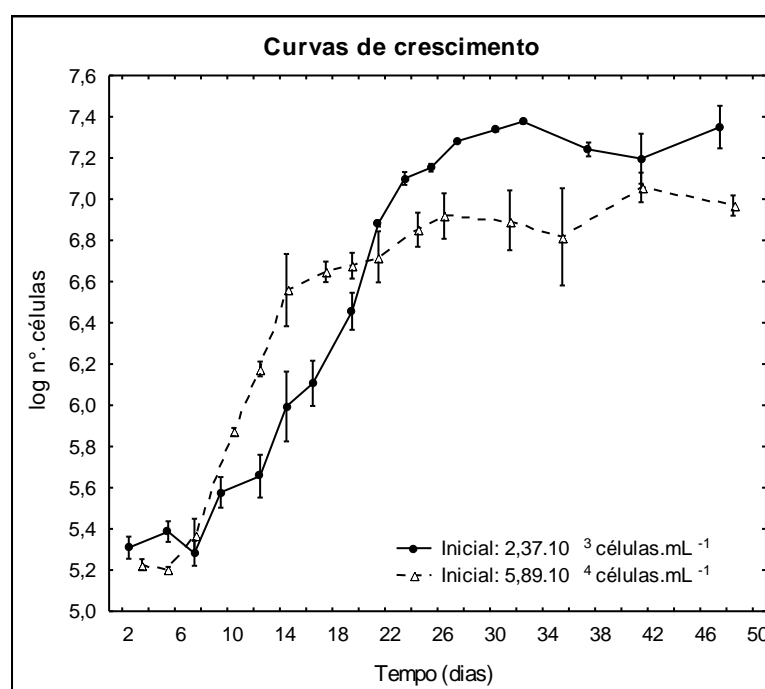


Figura 19 - Curvas de crescimento, baseadas em valores médios de contagem, da cepa BB005 (*M. aeruginosa*) utilizando diferentes concentrações celulares iniciais. Barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).

Durante a obtenção dos dados, para as curvas de crescimento, não foi utilizado o método de digestão da mucilagem sendo possível verificar que, em alguns períodos do crescimento, os desvios em relação às médias foram elevados devido à formação de colônias, citada anteriormente (item 5.1.1).

A fase *lag* de crescimento observada para os dois experimentos (Figura 19) possivelmente ocorreu devido à alteração de condições sofrida pelos inóculos utilizados nos experimentos, já que nos dois casos estes foram provenientes de cultivos realizados em tubos de ensaio e sem aeração.

De acordo com Hornes et al. (2010) o crescimento de cianobactérias, assim como de outros microrganismos, é fortemente influenciado pelas condições de disponibilidade de nutrientes de forma que este fator pode alterar tanto a taxa de crescimento como a biomassa formada. Este fator afetou o crescimento da *M. aeruginosa*, pois se observa que quando foram inoculadas $5,89 \cdot 10^4$ células.mL⁻¹ o crescimento inicial foi mais rápido em relação ao primeiro experimento, porém a duração da fase exponencial e a concentração celular foram menores do que quando foram utilizados inicialmente $2,37 \cdot 10^3$ células.mL⁻¹. Tais características foram resultantes, provavelmente, do esgotamento mais rápido dos nutrientes disponíveis, quando um maior número de células foi adicionado ao meio de cultivo.

Outro fator que possivelmente contribuiu para concentrações celulares inferiores, no segundo experimento em relação ao primeiro, foi a queda de temperatura, cujo controle não foi possível durante esta etapa do estudo. Segundo Imai et al. (2009) a temperatura exerce fundamental influência sobre as curvas de crescimento de cianobactérias, sendo que o desenvolvimento de cultivos de *M. aeruginosa* é favorecido em locais mais aquecidos (em temperaturas de até 35 °C).

As características de crescimento verificadas por Takenaka (2007), cuja cepa de *M. aeruginosa* utilizada foi a NPLJ-4, foram semelhantes àquelas verificadas neste estudo para a cepa BB005. A cepa NPLJ-4 apresentou término da fase exponencial em 20 dias de cultivo, baseado em experimentos com *erlenmeyers* de 4 a 6 L, condições de temperatura controlada (23 a 25 °C) e inoculações com 10% (10 mL de um cultivo contendo 10^7 células.mL⁻¹ em 100 mL do meio de cultura).

Diante do exposto, optou-se por utilizar maiores volumes de inóculo por estes fornecerem maiores duplicações celulares em menor tempo. Os resultados evidenciaram também a necessidade de controlar a variação da temperatura no local de cultivo para os testes seguintes.

5.3 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM MEIO ASM-1

Estudos têm evidenciado o papel fundamental dos nutrientes, compostos principalmente por nitrogênio, fósforo e ferro, como promotores de florações em ambientes naturais (WATANABE; OISHI, 1985; FALCONER, 2005; OU; WANG; CAI, 2005). Neste sentido a otimização do cultivo objetivou não só a busca pela condição de maior crescimento celular para a realização dos testes, mas também avaliar a influência da condição nutricional e de pH sobre as células. Os resultados da otimização favoreceram a realização dos cultivos nas condições disponíveis em laboratório.

A Tabela 7 apresenta os crescimentos médios calculados para cada condição nutricional e de pH testada durante os testes em tubos de ensaio.

Tabela 7 - Planejamento fatorial e crescimento médio verificado para *M. aeruginosa* nas condições testadas durante a primeira etapa do planejamento fatorial, em níveis experimentais inferiores (-) e superiores (+)

Condição	pH	Nitrogênio	Fósforo	Ferro	Crescimento médio μ (dia ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	0,56
2	1	-1	-1	-1	0,21
3	-1	1	-1	-1	0,44
4	1	1	-1	-1	0,00
5	-1	-1	1	-1	0,00
6	1	-1	1	-1	0,21
7	-1	1	1	-1	0,84
8	1	1	1	-1	0,00
9	-1	-1	-1	1	0,71
10	1	-1	-1	1	0,71
11	-1	1	-1	1	0,25
12	1	1	-1	1	0,44
13	-1	-1	1	1	0,49
14	1	-1	1	1	0,70
15	-1	1	1	1	0,50
16	1	1	1	1	0,50

Na primeira etapa do planejamento fatorial, realizada em tubos de ensaio, foi possível verificar que o maior efeito significativo ($p = 0,0061$), calculado à partir do crescimento médio, sobre a concentração celular foi consequência do nível superior de ferro (Figura 20). Quando esta variável estava em seu nível (+) a taxa de crescimento foi maior.

Esta etapa preliminar dos experimentos confirmou a importância do ferro para as células, já que este microelemento desempenha um papel fundamental na formação de estruturas celulares em cianobactérias (WILHELM, 1995). Nesta etapa, quando a interação com o pH é realizada, observa-se o segundo maior efeito ($p = 0,0133$) sobre a concentração celular (Figura 20).

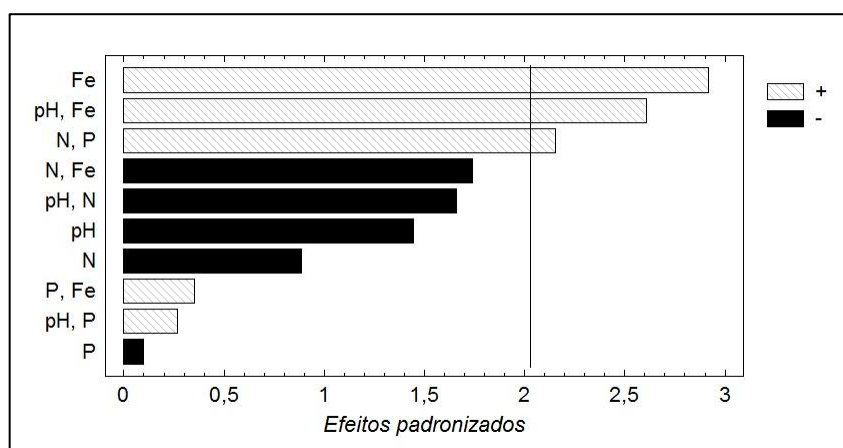


Figura 20 - Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos em relação à concentração celular em diferentes condições nutricionais, durante a primeira etapa do planejamento fatorial. A barra vertical indica o erro experimental padronizado ($n=3$).

A elevação do pH provavelmente alterou a solubilidade do ferro, pois em pH alcalino predominam compostos insolúveis deste elemento, que são de difícil utilização pelos organismos. De acordo com Silva (2006), nestas condições, as cianobactérias são capazes de sintetizar alguns peptídeos denominados sideróforos que lhes garante a solubilização e aproveitamento do Fe^{+3} e que, em condições de ausência das formas mais biodisponíveis, supre a demanda do elemento às células.

O terceiro maior efeito observado ($p = 0,0383$) ocorreu em virtude da interação simultânea entre os níveis (+) de nitrogênio e fósforo. Tal comportamento é justificável à medida que estes são elementos responsáveis por favorecer as florações de cianobactérias em ambientes aquáticos, por se tratarem de nutrientes fundamentais ao desenvolvimento de processos metabólicos nestes organismos (FERRÃO-FILHO; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

A Tabela 8 apresenta o crescimento calculado para cada condição nutricional e de pH testada durante a segunda etapa do planejamento fatorial.

Na segunda etapa do planejamento fatorial, realizada em experimento simples, foi possível avaliar comparativamente o baixo desenvolvimento das culturas

em pH básico uma vez que o nível (+) apresentou o maior efeito negativo em relação às outras variáveis (Figura 21).

Tabela 8 - Planejamento fatorial e crescimento médio verificado para *M. aeruginosa* nas condições testadas durante a segunda etapa do planejamento fatorial, em níveis experimentais inferiores (-) e superiores (+)

Condição	pH	Nitrogênio	Fósforo	Ferro	Crescimento μ (dia ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	1,43
2	1	-1	-1	-1	1,16
3	-1	1	-1	-1	1,50
4	1	1	-1	-1	1,39
5	-1	-1	1	-1	1,47
6	1	-1	1	-1	0,00
7	-1	1	1	-1	1,44
8	1	1	1	-1	1,33
9	-1	-1	-1	1	1,53
10	1	-1	-1	1	1,22
11	-1	1	-1	1	1,48
12	1	1	-1	1	1,45
13	-1	-1	1	1	1,52
14	1	-1	1	1	1,16
15	-1	1	1	1	1,46
16	1	1	1	1	1,41

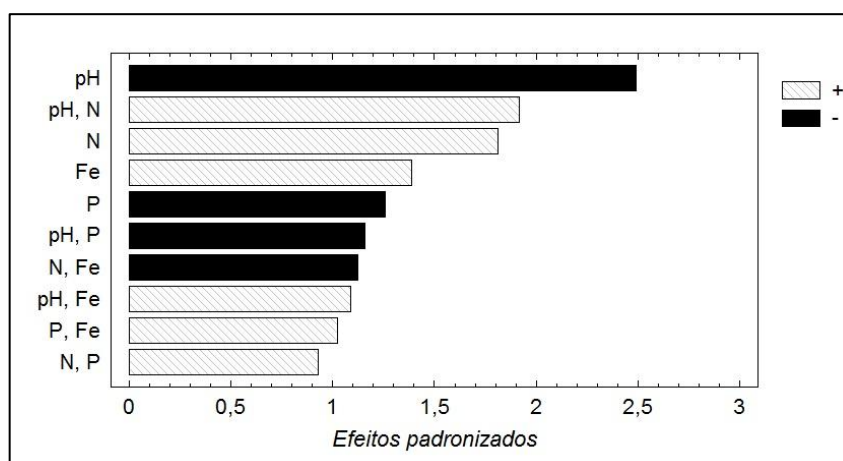


Figura 21 - Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos em relação à concentração celular em diferentes condições nutricionais, ao final da segunda etapa do planejamento fatorial (n=1).

Em condições de elevado pH ocorre o deslocamento do equilíbrio químico entre as formas de carbono inorgânico na água, de maneira que os carbonatos e bicarbonatos são preferencialmente formados em detrimento ao CO₂. Em baixas concentrações de CO₂ as células do gênero *Microcystis sp.* não são capazes de

evitar a fotoinibição e podem não crescer adequadamente (VISSER et al., 2005). Este comportamento justifica o elevado efeito negativo do pH sobre o crescimento celular, comparativamente aos outros efeitos verificados.

Outra característica, observada nos resultados da segunda etapa do planejamento fatorial, foi a relativa influência das maiores concentrações de nitrogênio. A interação entre o nível (+) de N e pH, bem como o nível (+) de N apenas, favoreceram o crescimento da cepa de *M. aeruginosa*.

As cianobactérias do gênero *Microcystis* não apresentam em sua fisiologia a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (VISSER et al., 2005). Este nutriente é fundamental na formação de vacúolos gasosos nas células e quando este apresenta-se em baixas concentrações o crescimento e a capacidade de flutuação das células ficam comprometidos (OLIVER; GANF, 2002). Neste sentido a maior disponibilidade de nitrogênio nos cultivos provavelmente favoreceu o crescimento.

Em estudo realizado por Jiang et al. (2008) foram utilizados 100 mL do meio de cultivo BG11 em condições controladas de temperatura, $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e o peso seco de células como a variável resposta e de forma semelhante aos dados obtidos, a presença de nitrogênio, fósforo e ferro em maiores concentrações favoreceram o crescimento celular. Para Xiang-Can et al. (2005) o fósforo em reduzidas concentrações limitou o aumento de biomassa ao utilizar condições de microcosmos em laboratório.

Em cultivos realizados por Vézic et al. (2002), no meio de cultura Z8, verificou-se que cepas não tóxicas de *M. aeruginosa* apresentaram menores taxas de crescimento, em relação as variedades tóxicas, quando as concentrações de nitrogênio e fósforo foram aumentadas cem vezes. Este fator pode ter influenciado nos maiores crescimento observados para a cepa BB005 (isolada a partir de uma floração tóxica) quando os nutrientes estavam no nível (+) do experimento.

De acordo com os resultados discutidos no gráfico de Pareto (Figura 21), os meios de cultura mais adequados seriam os de número 4 e 3, respectivamente, porém o crescimento irregular do cultivo devido à formação intensa de colônias inviabilizou a utilização dos mesmos.

O aspecto final dos cultivos, realizados na segunda etapa do planejamento fatorial, é apresentado na Figura 22.

As condições 9 e 13 do desenho experimental apresentaram efeito positivo sobre a concentração celular, bem como uma baixa formação de flocos ao longo do

experimento. Mesmo com crescimentos visualmente semelhantes neste caso, as concentrações de clorofila-a foram ligeiramente superiores para a condição 13 em três das quatro análises realizadas (1, 9 e 13 dias de cultivo) como pode ser observado na Figura 23. A pequena diferença nas concentrações de clorofila-a, verificada entre os cultivos 9 e 13, deve-se à composição semelhante dos mesmos.

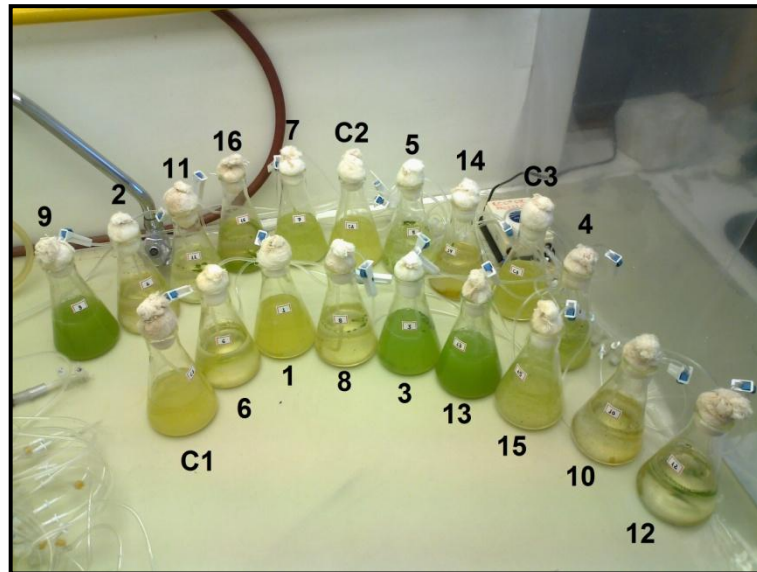


Figura 22 - Aspecto dos cultivos de *M. aeruginosa* ao final da segunda etapa do planejamento fatorial 2^4 (n=1). C1-C3: controles.

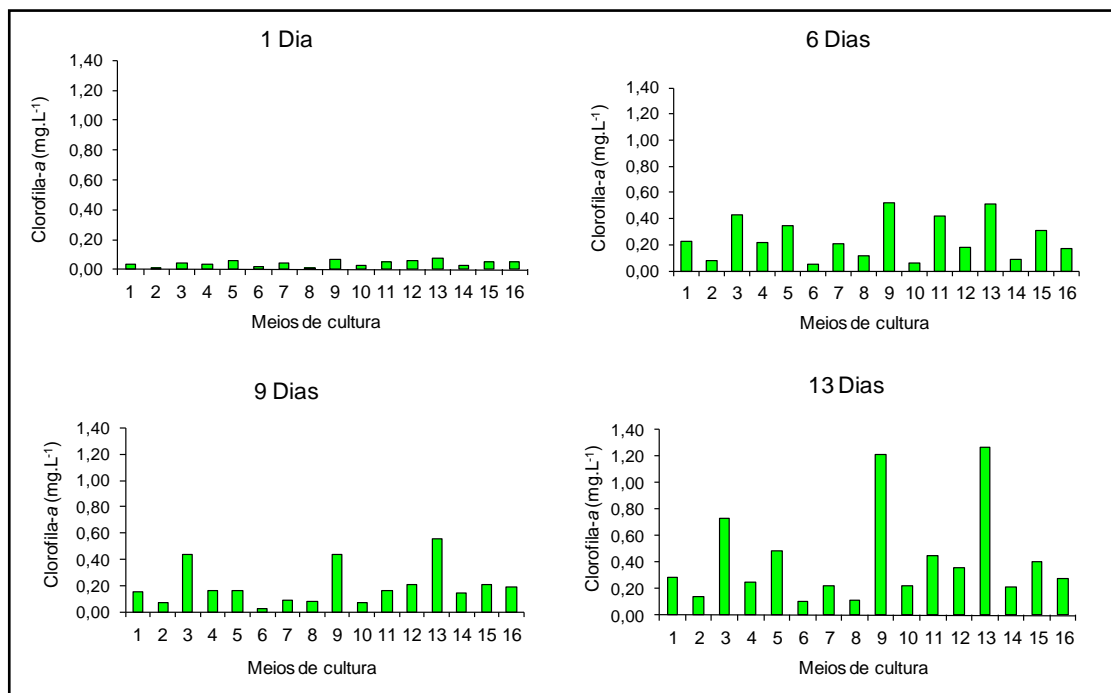


Figura 23 - Concentração de clorofila-a nas condições nutricionais testadas durante o planejamento fatorial (n=1), em relação ao tempo de cultivo.

Segundo Ou, Wang e Cai (2005) e Dziga *et al.* (2007), as células de *M. aeruginosa* apresentam naturalmente grande demanda por fósforo e sendo assim, no presente estudo optou-se por utilizar o meio de cultura 13 (que além do nível superior de ferro possui também mais fósforo) para os testes de inibição, de forma a manter as concentrações deste elemento e evitar a limitação do crescimento.

5.4 PREPARO DOS EXTRATOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

A viabilidade de aplicação de extratos vegetais na remediação de florações depende não só da atividade inibitória dos compostos fitoquímicos sobre as células, mas também das características operacionais que viabilizem a produção destes materiais. Neste sentido, o rendimento do processo de extração desempenha um papel de grande importância para o estudo.

Baseado na massa seca de planta utilizada, e no extrato final (descontadas as perdas durante o processo), o maior rendimento foi obtido para a espécie *Sagittaria montevidensis* (22,63%) e menor para *Ludwigia cf. peruviana* (7,55%). O rendimento de extração das macrófitas aquáticas e o método utilizado estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Rendimentos de extração em etanol 80% (v/v) para as espécies de macrófitas aquáticas de estudo.

Extrato	Massa inicial de plantas pulverizadas (g)	Método de extração	Rendimento (%)
<i>Eichhornia azurea</i>	40	ultrassom	14,50
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	25	ultrassom	12,60
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	40	ultrassom	7,55
<i>Myriophyllum cf. aquaticum</i> (partes aéreas)	50	maceração 48 h	20,29
<i>Myriophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	80	maceração 48 h	7,58
<i>Pontederia cordata</i>	20	ultrassom	12,40
<i>Sagittaria montevidensis</i>	30	ultrassom	22,63
<i>Typha domingensis</i>	30	ultrassom	10,90

O mesmo processo de extração para ambas as espécies utilizadas permitem concluir que, possivelmente, o que influenciou no rendimento foram as diferentes quantidades de compostos solúveis em etanol para cada uma das espécies.

Após as primeiras extrações, através da maceração por 48 h, optou-se por utilizar o método de ultrassom, de maneira a obter extratos em menores tempos, conforme sugerido por Victório, Lage e Kuster (2010).

A separação entre raízes e partes aéreas, foi possível somente para a macrófita *M. cf. aquaticum*, uma vez que a quantidade de raízes presentes nas outras espécies coletadas não viabilizou esta divisão, e foi realizada de forma a verificar possíveis diferenças entre estas duas regiões da planta em relação à presença de substâncias com atividade inibitória sobre o crescimento de *M. aeruginosa*.

5.5 TESTES DE INIBIÇÃO

Nesta etapa do estudo foram utilizados os parâmetros contagem celular e fluorescência, por estes apresentarem maior eficiência na obtenção dos resultados como foi discutido nos itens 5.1.1 e 5.1.2.

Inicialmente, o extrato obtido das raízes de *M. cf. aquaticum* foi avaliado quanto ao potencial de inibição do crescimento em fase exponencial de *M. aeruginosa*. Nesse experimento foi possível observar que o crescimento celular foi inibido de forma mais efetiva na concentração de 1000 mg.L⁻¹ do extrato (Figura 24), havendo uma redução ao longo do experimento (10 dias) de 2,06 (±0,10).10⁶ células.mL⁻¹ para 3,31 (±0,80).10⁵ células.mL⁻¹. Os valores de concentração celular nos testes com 100 e 1000 mg.L⁻¹ apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação aos controles ($p=0,00039$ e $p=0,00018$ respectivamente), sendo possível verificar, através da Figura 24, maiores taxas de inibição nestas condições.

Após a aplicação do extrato das raízes de *M. cf. aquaticum*, o intervalo de concentração testado para os demais extratos foi estabelecido com o intuito de verificar as concentrações mínimas responsáveis pela inibição. Também a partir do experimento inicial, no qual foi verificada a tendência de crescimento celular durante o tempo de exposição ao extrato, as amostragens durante os testes de inibição foram também reduzidas para 0, 2, 5, 7 e 10 dias.

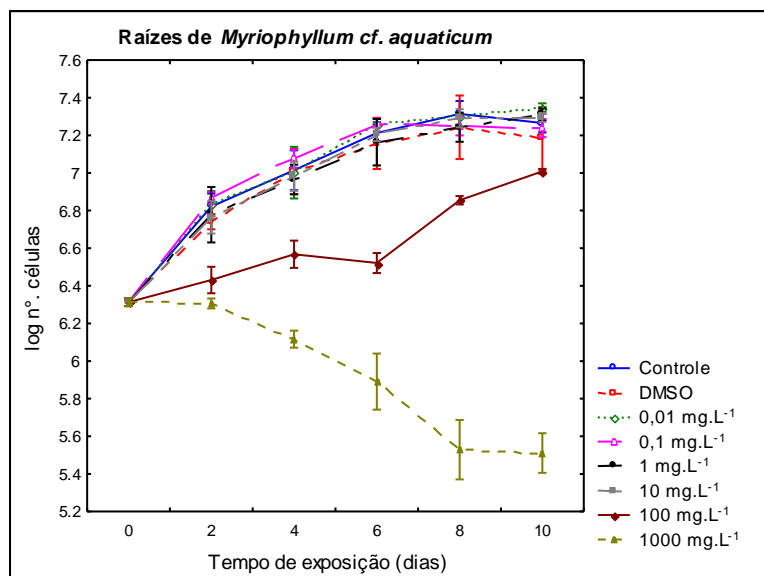


Figura 24 – Valores médios de crescimento da cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa* exposta aos extratos obtidos de raízes de *M. cf. aquaticum*, em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).

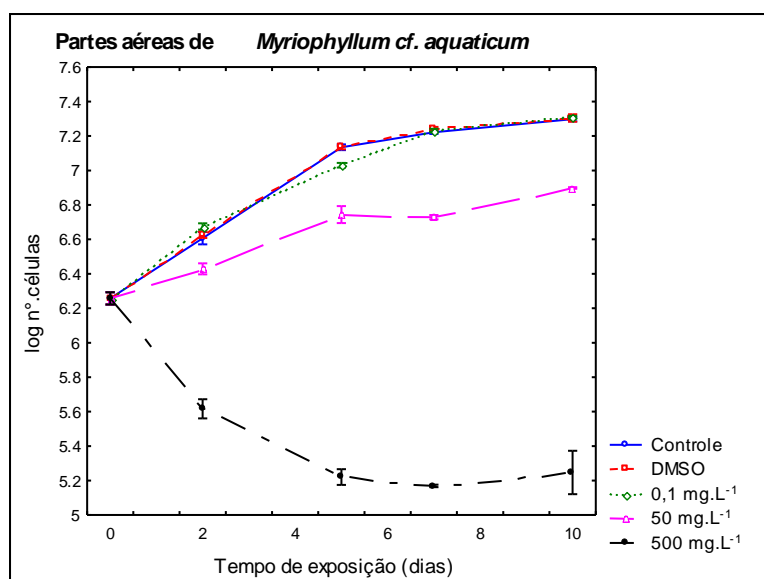


Figura 25 - Valores médios de crescimento da cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa* exposta aos extratos obtidos de partes aéreas de *M. cf. aquaticum*, em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).

Com a aplicação do extrato obtido das partes aéreas de *M. cf. aquaticum* (Figura 25) é possível verificar efeito inibitório já na concentração de 50 mg.L⁻¹ (diferença estatística significativa em relação ao controle $p=0,00089$); contudo, o maior efeito significativo ocorreu quando foi utilizada a concentração

500 mg.L⁻¹ ($p=0,00018$), em que a concentração celular decresceu, após dez dias de aplicação, de $1,81 (\pm 0,15) \cdot 10^6$ células.mL⁻¹ para $1,81 (\pm 0,49) \cdot 10^5$ células.mL⁻¹.

A Figura 26 apresenta os valores de intensidade de fluorescência obtidos ao longo do experimento de inibição, com o extrato das partes aéreas de *M. cf. aquaticum*. As intensidades de sinal apresentaram aumento, nas condições controle e com 0,1 mg.L⁻¹ de extrato, até o quinto dia do experimento, seguido de uma queda acentuada nos sinais observados. Tal comportamento pode ser resultante da inativação de pigmentos fotossintéticos que, de acordo com Bodemer (2004), tem início na fase estacionária de crescimento do organismo. Verificando a Figura 25 se observa que o cultivo atingiu a fase estacionária no quinto dia de exposição ao extrato. O período de cultivo neste caso foi de 10 dias (5 para a obtenção das alíquotas e mais 5 dias de exposição) sem mudanças na condição do inóculo para o teste, de maneira a não possibilitar o aparecimento da fase *lag*.

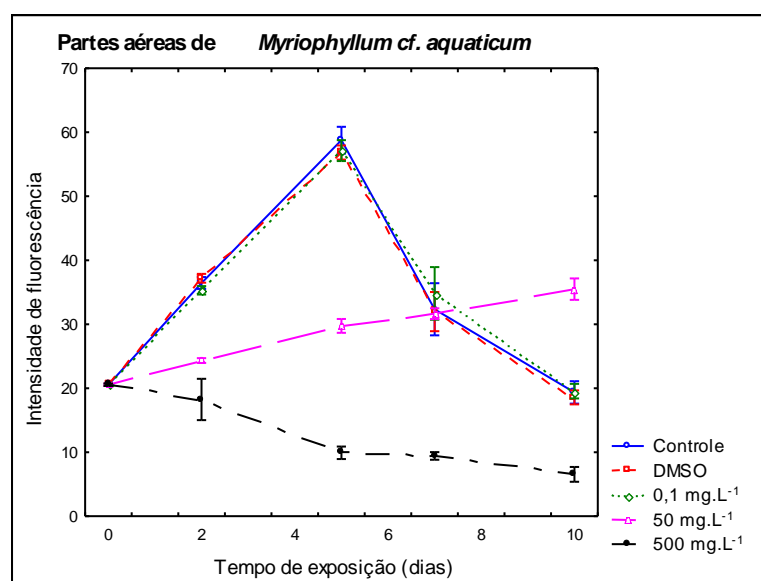


Figura 26 - Valores médios de fluorescência da cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa* exposta aos extratos obtidos de partes aéreas de *M. cf. aquaticum*, em diferentes concentrações. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).

As intensidades de fluorescência dos recipientes teste, contendo 500 mg.L⁻¹ de extrato, confirmaram a inibição verificada na Figura 25, porém os frascos contendo 50 mg.L⁻¹ apresentaram redução na concentração celular acompanhada

do aumento nas intensidades de fluorescência. O menor consumo de nutrientes, resultante de concentrações celulares menores em relação ao controle, permitiu a manutenção da viabilidade celular por maior tempo e intensidades de fluorescência gradativamente maiores.

A Figura 27 apresenta a configuração dos experimentos com os dois extratos de *M. cf. aquaticum*.

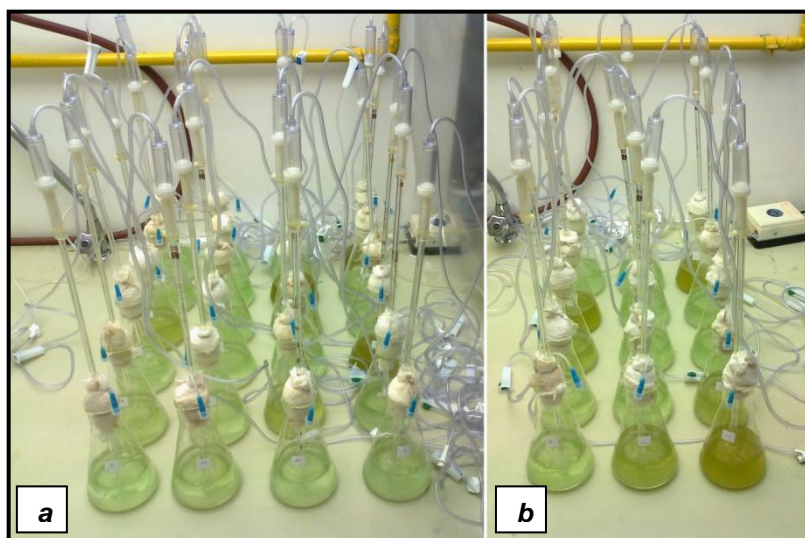


Figura 27 – Aspecto inicial dos testes de inibição da cepa BB005 de *M. aeruginosa* a) utilizando extratos obtidos das raízes de *M. cf. aquaticum* b) com extrato das partes aéreas desta.

O emprego de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas com a finalidade de controle de cianobactérias é relativamente recente e, por este motivo existem ainda poucos estudos que utilizam estes vegetais aquáticos para esta finalidade. As espécies vegetais mais relatadas nestes poucos estudos pertencem ao gênero *Myriophyllum* sp.

Em estudo realizado por Cheng et al. (2008) foi possível verificar a inibição de *M. aeruginosa* pela espécie *M. cf. aquaticum* em taxas de até 89,61% em condições controladas de temperatura e utilizando a adição do meio de cultura, em que a macrófita foi mantida, aos cultivos da cianobactéria ao invés de extratos hidroalcoólicos. De acordo com esse estudo, as células foram inibidas devido à possíveis danos ao aparato fotossintético das células, uma vez que os sinais de absorvância dos cultivos sofreram redução ao longo dos testes.

Foram também verificados efeitos inibitórios ao utilizar extratos, obtidos das partes vegetativas, de outras espécies de macrófitas aquáticas (Figura 28).

O extrato obtido da espécie *Eichhornia azurea* inibiu o crescimento da cepa de *M. aeruginosa* mais acentuadamente em 500 mg.L⁻¹ (Figura 28 a). Nesta concentração o número de células permaneceu quase inalterado em relação à amostra inicial e apresentou um valor mínimo igual a 1,28 (±0,28).10⁶ células.mL⁻¹, em 7 dias de exposição, porém, as concentrações foram significativamente menores em relação ao controle ($p=0,00018$). Na última amostragem o número de células aumentou para 2,21 (±0,30).10⁶ células.mL⁻¹, indicando uma provável redução no efeito inibitório observado ao longo do experimento. O teste contendo 50 mg.L⁻¹ de extrato não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao controle indicando a efetividade na maior concentração testada. Os resultados verificados confirmam o efeito alelopático de espécies do gênero *Eichhornia sp.* para organismos fitoplanctônicos, relatado por Huang et al.² (1999 apud RIBEIRO, 2007, p. 10).

Ao testar o extrato obtido da espécie *Eleocharis cf. acutangula* (Figura 28 b) verificou-se, através das médias obtidas, que o crescimento celular foi significativamente reduzido em relação ao controle na concentração de 500 mg.L⁻¹ ($p=0,00018$). A concentração celular diminuiu de 2,49 (±0,07).10⁶ células.mL⁻¹ para 1,09 (±0,08).10⁶ células.mL⁻¹ enquanto que o controle, contendo a mesma concentração celular inicial, aumentou para 2,74 (±0,15).10⁷ células.mL⁻¹. Apesar de a maior concentração ter apresentado um efeito inibitório superior, é possível observar redução significativa nas contagens celulares nos testes contendo 50 mg.L⁻¹ de extrato em relação ao controle ($p=0,00388$).

O extrato de *Ludwigia cf. peruviana* (Figura 28 c) apresentou o maior efeito inibitório significativo na concentração de 500 mg.L⁻¹ de extrato ($p=0,00018$) verificou-se, após 10 dias de exposição, que a concentração celular foi reduzida de 2,49 (±0,07).10⁶ células.mL⁻¹ para 5,23 (±0,37).10⁵ células.mL⁻¹. Efeitos inibitórios significativos em relação ao controle puderam ser observados já na concentração de 50 mg.L⁻¹ ($p=0,01050$).

² HUANG, S.; WANG, W.; MA, K.; ZHOU, H.; XU, Y.; WU, H.; SUN, W.; YANG, S.. Allelochemicals from root exudates and extracts of water hyacinth *Eichhornia crassipes*. In: MÁCIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G. (Ed.). Advances in Allelopathy. p. 197-204, 1999.

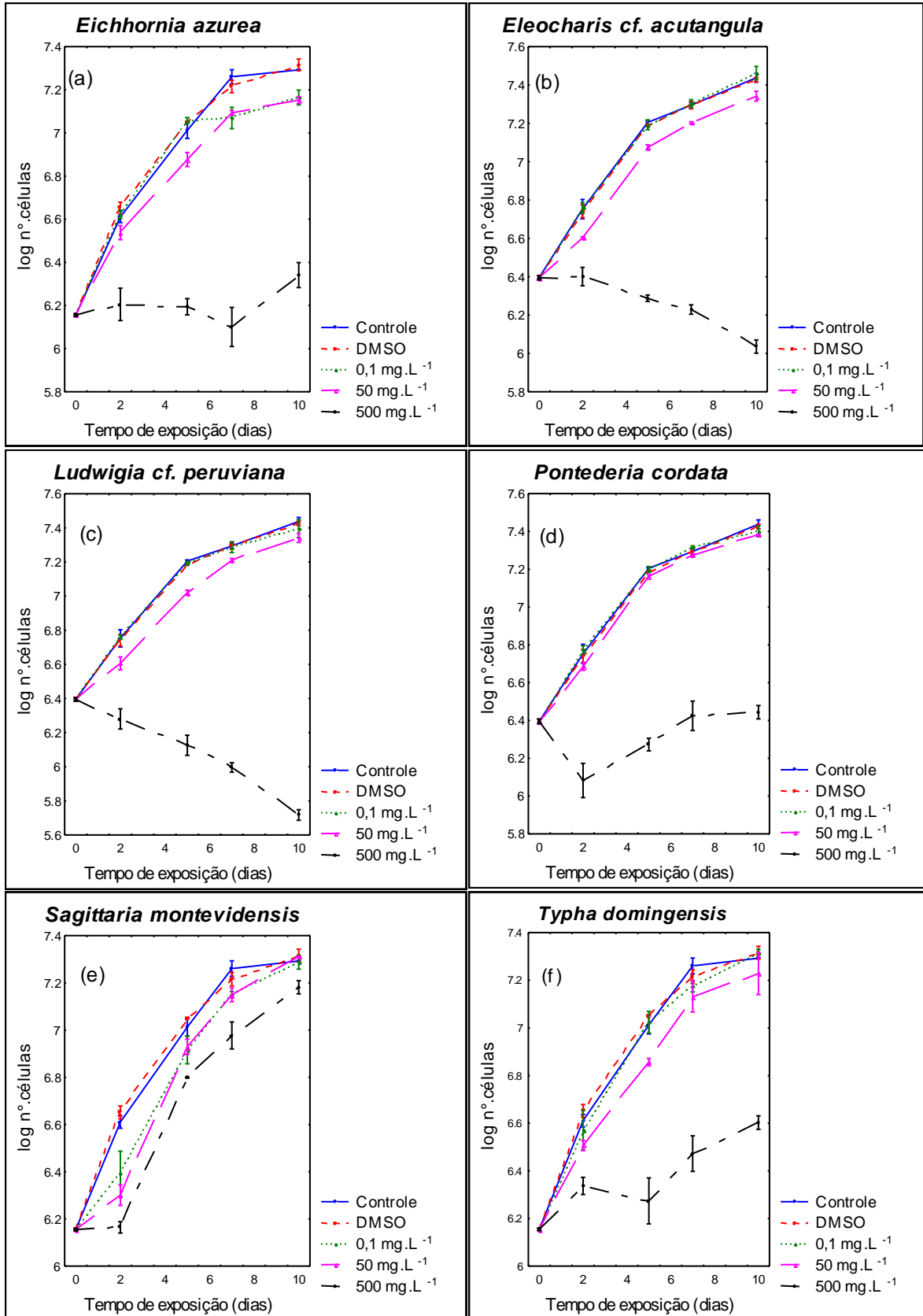


Figura 28 - Valores médios de crescimento da cepa BB005 de *M. aeruginosa* exposta aos extratos obtidos. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3). a) *Eichhornia azurea*; b) *Eleocharis cf. acutangula*; c) *Ludwigia cf. peruviana*; d) *Pontederia cordata*; e) *Sagittaria montevidensis*; f) *Typha domingensis*.

Efeitos inibitórios foram verificados por Ahmed, Selim e Shilpi (2011), em estudo que utilizou extratos metanólicos da espécie *Ludwigia adscendens* L. em culturas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas em meio sólido. As zonas de inibição observadas nos cultivos confirmaram a atividade dessa espécie vegetal sobre o crescimento bacteriano. Análises fitoquímicas realizadas previamente verificaram a presença de fenóis e taninos no extrato, atribuídos como responsáveis pelo efeito bactericida.

O extrato da espécie *Pontederia cordata* (Figura 28 d) apresentou efeito inibitório significativo apenas na concentração de 500 mg.L⁻¹ ($p=0,00019$). O valor médio entre as contagens indicou uma redução inicial no crescimento, seguida de uma tendência a maiores concentrações celulares durante as amostragens seguintes, de forma que ao final deste experimento, se estabeleceu em 2,78 ($\pm 0,22$).10⁶ células.mL⁻¹.

Nas condições testadas a espécie *Sagittaria montevidensis* não apresentou atividade inibitória significativa em relação a *M. aeruginosa* (Figura 28 e), sendo possível verificar crescimentos semelhantes entre os controles e as concentrações teste. Tal comportamento pode indicar a baixa efetividade dos compostos extraídos desta espécie, na redução das concentrações celulares da *M. aeruginosa*.

A reduzida inibição observada durante a aplicação do extrato pode sugerir a presença de compostos de baixo efeito para a espécie *M. aeruginosa*, uma vez que Tanaka et al. (2010) verificaram que extratos metanólicos de *S. montevidensis* apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de algumas bactérias Gram-negativas em cultivos sólidos.

Ao utilizar o extrato da espécie *Typha domingensis* (Figura 28 f), na concentração de 500 mg.L⁻¹, obteve-se contagens celulares significativamente inferiores em relação ao controle do teste ($p=0,00029$), porém verificou-se o aumento gradativo no número de células a cada amostragem, de forma que a concentração celular final foi de 4,01 ($\pm 0,27$).10⁶ células.mL⁻¹.

Utilizando 0,5% de extratos aquosos da espécie *Typha orientalis*, Chen et al. (2012) verificaram reduzidas concentrações celulares nos cultivos de uma cepa de *M. aeruginosa* mantidos a temperatura de 25 °C, em meio de cultura líquido BG-11 e sem aeração. A atividade inibitória verificada foi atribuída, principalmente, a compostos fenólicos nos extratos.

A utilização do solvente DMSO não afetou o crescimento e possivelmente não influenciou nas inibições que ocorreram, uma vez que não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o controle comum e aquele contendo o DMSO em todos os testes. O volume de DMSO do controle foi o mesmo utilizado para solubilizar os extratos, portanto em um mesmo experimento o volume de DMSO no controle e nas concentrações de extrato testadas foi o mesmo.

A Figura 29 apresenta os valores médios de fluorescência para os cultivos de *M. aeruginosa*, expostos aos extratos das partes vegetativas das macrófitas aquáticas testadas.

A fluorescência indicou a influência dos diferentes extratos testados sobre os pigmentos celulares, uma vez que o perfil das intensidades observadas foi diferente entre os extratos e entre as concentrações testadas. A reduzida intensidade, na concentração de 500 mg.L^{-1} , para os extratos de *E. cf. acutangula* e *L. cf. peruviana*, indicam a degradação de pigmentos fotossintetizantes que pode estar associada à fase estacionária dos cultivos, como mencionado anteriormente.

Através deste parâmetro observou-se também que a maior concentração dos extratos de *E. azurea*, *P. cordata*, *S. montevidensis* e *T. domingensis* (Figura 29 a, d, e, f) não foram suficientes para inibir o crescimento de forma efetiva, uma vez que após uma redução inicial na fluorescência os cultivos voltaram a crescer, como foi verificado através do crescimento celular representado na Figura 28.

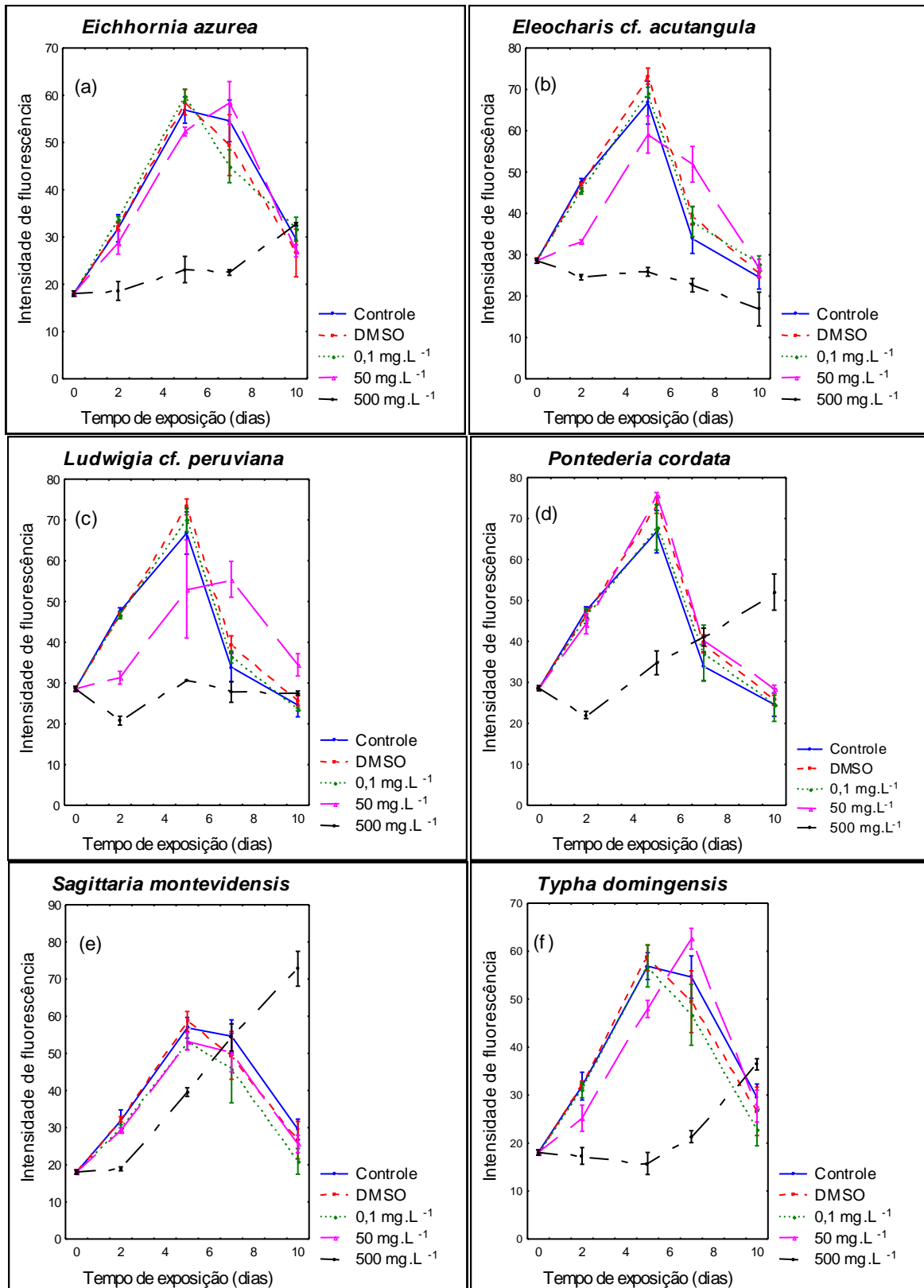


Figura 29 - Valores médios de fluorescência da cepa BB005 de *M. aeruginosa* exposta aos extratos obtidos. Barras verticais indicam o desvio padrão (n=3). a) *Eichhornia azurea*; b) *Eleocharis cf. acutangula*; c) *Ludwigia cf. peruviana*; d) *Pontederia cordata*; e) *Sagittaria montevidensis*; f) *Typha domingensis*.

De maneira a melhor comparar as inibições observadas e verificar o extrato de maior efetividade na redução do número de células, as taxas de inibição (Tabela 10) foram calculadas a partir da concentração de 500 mg.L⁻¹, com exceção do extrato obtido das raízes de *M. cf. aquaticum*, no qual a concentração de 1000 mg.L⁻¹ foi a mais efetiva dentre aquelas testadas.

Tabela 10 - Taxas de inibição celular média (\pm desvio padrão) para *M. aeruginosa*, observadas com os extratos de macrófitas aquáticas em concentrações efetivas (n=3), em que N₀ e N indicam a concentração celular no recipiente controle e no recipiente teste, respectivamente, após 10 dias de experimento, e TI a taxa de inibição calculada.

Amostra teste	Concentração de extrato (mg.L ⁻¹)	N ₀ médio (células.mL ⁻¹)	N médio (células.mL ⁻¹)	TI (%)
<i>Eichhornia azurea</i>	500	1,96.10 ⁷	2,21.10 ⁶	88,7 (\pm 1,6)
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	500	2,74.10 ⁷	1,09.10 ⁶	96,0 (\pm 0,3)
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	500	2,74.10 ⁷	5,23.10 ⁵	98,1 (\pm 0,1)
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (aéreas)	500	1,99.10 ⁷	1,81.10 ⁵	99,1 (\pm 0,2)
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (raízes)	1000	1,05.10 ⁷	1,31.10 ⁶	87,6 (\pm 1,3)
<i>Pontederia cordata</i>	500	2,74.10 ⁷	2,74.10 ⁷	89,9 (\pm 0,8)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	500	1,96.10 ⁷	1,52.10 ⁷	22,5 (\pm 5,0)
<i>Typha domingensis</i>	500	1,96.10 ⁷	4,01.10 ⁶	79,6 (\pm 1,4)

Foi possível observar que com a exposição ao extrato das partes aéreas de *M. cf. aquaticum* a inibição foi de 99,1 (\pm 0,1)%, enquanto que o menor efeito observado ocorreu quando as células foram expostas a *S. montevidensis*, já que a taxa foi de 22,5 (\pm 5,0)%.

Durante os experimentos, as células apresentaram-se bastante danificadas quando expostas aos extratos de *M. cf. aquaticum* e *L. cf. peruviana* nas maiores concentrações. Possivelmente a presença de saponinas nestes extratos, confirmada no item 5.6.2, contribuiu para os danos verificados, uma vez que Schenkel, Gosmann e Athayde (2004) afirmam que estes compostos atuam principalmente nas membranas celulares podendo ocasionar a morte dos organismos.

Os experimentos que continham 500 mg.L⁻¹ de extrato, por apresentarem maior efeito inibitório entre as concentrações testadas, foram utilizados como inóculo para a verificação dos efeitos bacteriostáticos e bactericidas, ao final do período de

exposição ao extrato. Nesta etapa foi possível avaliar a efetividade dos extratos ao expor as células a uma nova fonte de nutrientes.

Na Tabela 11 é possível verificar a concentração celular no início da reinoculação, realizada em meio ASM-1 estéril sem adição de extratos, e após 10 dias de cultivo nestas condições.

Tabela 11 - Concentração celular média (\pm desvio padrão), em tubos de ensaio, no momento da reinoculação e após 10 dias de cultivo em meio ASM-1 estéril sem adição de extratos (n=3).

Amostra teste da qual o inóculo inicial foi obtido	Númeraço das réplicas	Concentraço celular inicial (células.mL ⁻¹)	Concentraço celular final (células.mL ⁻¹)
Controle	1 - 3	2,18 (\pm 0,03).10 ⁶	1,02 (\pm 0,09).10 ⁷
Controle DMSO	4 - 6	2,09 (\pm 0,18).10 ⁶	1,07 (\pm 0,02).10 ⁷
<i>Eichhornia azurea</i>	7 - 9	2,81 (\pm 0,24).10 ⁵	5,41 (\pm 0,34).10 ⁶
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	10 - 12	2,35 (\pm 0,37).10 ⁴	0
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	13 - 15	6,93 (\pm 0,33).10 ⁴	0
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (aéreas)	16 - 18	1,71 (\pm 0,37).10 ⁴	0
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (raízes)	19 - 21	4,05 (\pm 0,10).10 ⁴	0
<i>Pontederia cordata</i>	22 - 24	3,17 (\pm 0,54).10 ⁵	8,35 (\pm 0,38).10 ⁶
<i>Sagittaria montevidensis</i>	25 - 27	2,02 (\pm 0,04).10 ⁶	1,36 (\pm 0,03).10 ⁷
<i>Typha domingensis</i>	28 - 30	1,21 (\pm 0,05).10 ⁶	1,16 (\pm 0,01).10 ⁷

Não foram verificados organismos viáveis nas reinoculaço das células expostas aos extratos obtidos de *E. cf. acutangula*, *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum*, após 10 dias de cultivo. Opostamente, observa-se que os cultivos de células expostas aos extratos de *E. azurea*, *P. cordata*, *S. montevidensis* e *T. domingensis* voltaram a crescer, de forma que as concentraço celulares finais foram de 5,41.10⁶; 8,35.10⁶; 1,36.10⁷ e 1,16.10⁷ células.mL⁻¹ respectivamente.

Os dados permitem afirmar que os extratos de *E. cf. acutangula*, *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum* causaram efeito bactericida às células de *M. aeruginosa*, uma vez que após a inibiço observada as células não voltaram a crescer quando inoculadas em meio ASM-1 estéril. Por outro lado, os extratos *E. azurea*, *P. cordata* e *T. domingensis*, mesmo apresentando efeitos inibitórios

quando aplicados nos cultivos, causaram efeito bacteriostático, uma vez que as células apresentaram crescimento quando reinoculadas.

A Figura 30 apresenta o aspecto, ao final de 10 dias, das reinoculações realizadas em tubos de ensaio.

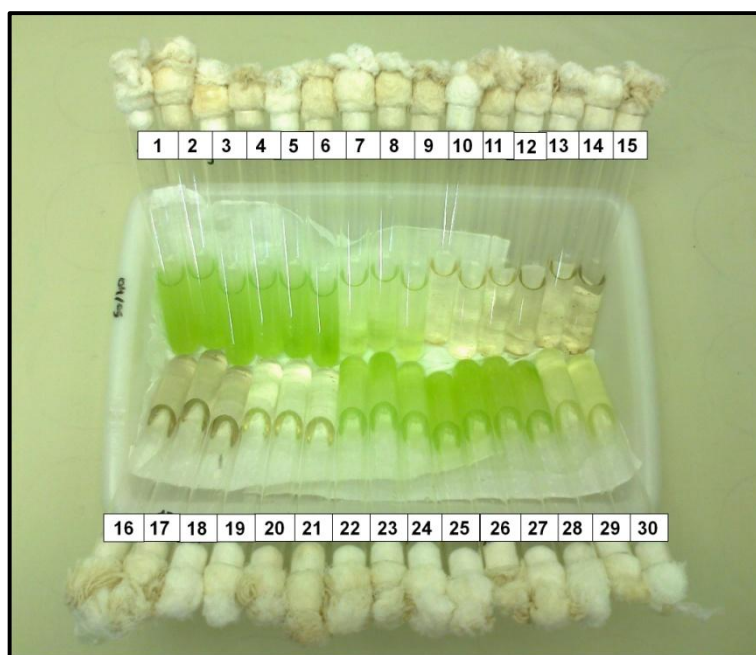


Figura 30 - Aspecto das reinoculações realizadas em tubos de ensaio (n=3) das amostras provenientes dos testes de inibição, após 10 dias de cultivo, com a respectiva numeração

Os efeitos bacteriostáticos verificados podem ser atribuídos à natureza química e espectro de ação da diversidade de substâncias presentes nos extratos de *E. azurea*, *P. cordata*, *S. montevidensis* e *T. domingensis*, assim como a uma possível degradação ou modificação estrutural desses compostos ativos durante o período de exposição. De acordo com Vidal e Bauman (1997), vários metabólitos secundários vegetais são susceptíveis à degradação por processos físicos, químicos e microbiológicos, dos quais é possível destacar a inativação de compostos fenólicos por processos fotoquímicos. Katase (1981) verificou a formação de isômeros químicos, que não apresentavam atividade inibitória, quando compostos fenólicos (ácidos *p*-cumárico e ferúlico) foram expostos à luz fluorescente.

As diferentes inibições, observadas durante os testes, reforçam as hipóteses de que as macrófitas aquáticas produzem metabólitos secundários em quantidades e estruturas químicas que variam entre espécies e cujos efeitos sobre os organismos são também diversos, como afirmado por Hu e Hong (2008).

5.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS

De forma a avaliar se a inibição celular é proporcional à redução da toxicidade da cepa, a análise de microcistina-LR foi realizada nos cultivos expostos aos extratos hidroalcoólicos produzidos.

A calibração do método para microcistina resultou na regressão apresentada na Figura 31, cujos coeficientes de correlação e de determinação foram $r = -0,9790$ e $r^2 = 0,9585$ ($p = 0,0210$). O valor negativo verificado é resultante da característica de detecção do método, em que a coloração resultante do preparo da amostra é mais intensa quanto menor for a concentração de microcistina-LR.

A regressão obtida foi então utilizada para a determinação da toxina nos cultivos dos testes de inibição.

A análise de microcistina-LR foi realizada com alíquotas obtidas em experimentos de inibição contendo 500 mg.L^{-1} dos extratos, uma vez que esta concentração apresentou maior efeito inibitório às células.

Antes da aplicação dos extratos, o cultivo inicial utilizado nos testes apresentou a concentração celular de $2,13 (\pm 0,18) \cdot 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$, contendo $0,216 \text{ ppb}$ de microcistina-LR.

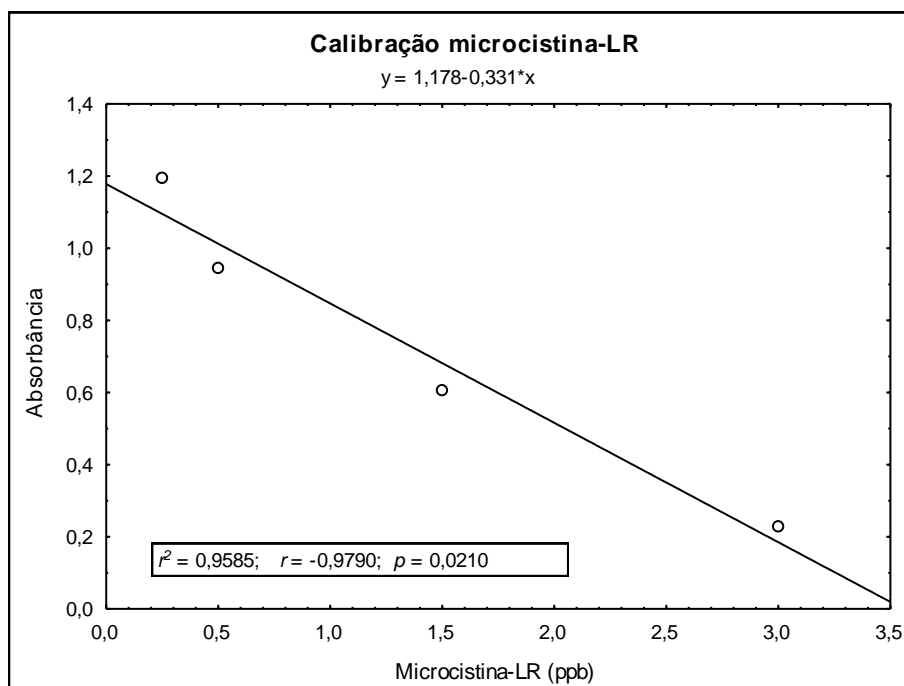


Figura 31 - Correlação entre a concentração de microcistina-LR e a absorbância

As concentrações da cianotoxina, analisadas após 10 dias de exposição aos extratos, correlacionada com o número de células de *M. aeruginosa* podem ser verificadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração de microcistina-LR, dos experimentos de inibição, contendo 500 mg.L⁻¹ dos extratos testados após 10 dias de exposição, relacionada com a concentração celular (n=1).

Amostra teste	Concentração celular média (células.mL ⁻¹) T = 10 dias	Microcistina-LR (ppb)
Controle	2,18.10 ⁷	1,184
Controle DMSO	2,09.10 ⁷	1,175
<i>Eichhornia azurea</i>	2,81.10 ⁶	0,234
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	2,35.10 ⁵	0,610
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	6,93.10 ⁵	0,243
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (aéreas)	1,71.10 ⁵	0,232
<i>Miryophillum cf. aquaticum</i> (raízes)	4,05.10 ⁵	0,232
<i>Pontederia cordata</i>	3,17.10 ⁶	0,267
<i>Sagittaria montevidensis</i>	2,02.10 ⁷	0,222
<i>Typha domingensis</i>	1,21.10 ⁷	0,240

Os dados obtidos permitem afirmar que o solvente DMSO exerceu pouca ou nenhuma influência na produção de microcistina-LR pelas células, já que o controle e o controle com DMSO apresentaram concentrações de toxina iguais a 1,184 e 1,175 ppb respectivamente.

Foi possível observar que todos os extratos testados inibiram a produção de microcistina-LR pela cepa de *M. aeruginosa*, ao se comparar com os controles. O extrato que apresentou maior efeito inibitório, em relação à produção de microcistina, foi o de *S. montevidensis* em que a concentração ao final do período de exposição foi de 0,222 ppb; por outro lado, o menor efeito inibitório pode ser observado para o extrato da espécie *E. cf. acutangula* que apresentou a concentração final de 0,610 ppb. O efeito sobre a produção de microcistina-LR é evidenciado se forem observados os valores de concentração celular nos testes com estes extratos, que para *E. cf. acutangula* foi $2,35 \cdot 10^5$ células.mL⁻¹ e para *S. montevidensis* $2,02 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹, sendo possível constatar que, mesmo em concentrações celulares maiores, as células sintetizaram menores concentrações da toxina devido a possível influência do extrato.

Comparando com os resultados discutidos no item 5.5 é possível verificar que a inibição celular não resulta necessariamente na redução de toxicidade da cepa. O cultivo exposto ao extrato de *S. montevidensis* apresentou ao final do experimento uma concentração celular semelhante ao controle contendo, porém, uma concentração de microcistina-LR cinco vezes menor. Em contrapartida, o extrato de *E. cf. acutangula*, que apresentou um dos maiores efeitos inibitórios ao crescimento celular, não inibiu efetivamente a produção de toxina.

Esta característica foi observada por Dziga et al. (2007), em que cultivos de *M. aeruginosa* foram expostos aos polifenóis pirogallol e hidroquinona, que são fitoquímicos produzidos por plantas. Os parâmetros concentração celular e microcistina-LR não apresentaram correlação estatística significativa. As células sofreram danos ao aparato fotossintético sendo conseqüentemente inibidas e, por fatores que ainda não são completamente conhecidos, os organismos que sobreviveram produziram maiores concentrações de toxina.

A presença de fenóis de acordo com Haslam³ (1989 apud DZIGA et al. 2007, p. 344) pode formar complexos com algumas proteínas celulares e limitar a ação do conjunto enzimático do organismo. Provavelmente este mecanismo alterou a produção da toxina pelas células, uma vez que a biosíntese desta é realizada por genes específicos responsáveis por codificar a enzima microcistina sintetase, produtora de microcistinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; PINTO, 2011), justificando a inibição da produção de microcistina-LR pelos extratos.

Os resultados obtidos permitem afirmar que a utilização de macrófitas aquáticas, para o controle de cianobactérias, deve ser realizada de maneira criteriosa, uma vez que determinadas extratos podem aumentar a toxicidade da floração através da maior produção de microcistinas. A aplicação deve ser monitorada rigorosamente de maneira a reduzir a possibilidade de efeitos adversos à outros organismos aquáticos. Estudos de isolamento e identificação de princípios ativos vegetais mais adequados são essenciais para o controle eficiente de cianobactérias da espécie *M. aeruginosa* pelo método proposto.

5.6 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Devido à elevada quantidade de compostos fitoquímicos que apresentam efeitos sobre o crescimento de outros organismos vivos, neste estudo preliminar os extratos obtidos foram avaliados quanto à presença das principais classes destas substâncias naturais, de forma a justificar os diferentes efeitos inibitórios observados.

A análise preliminar dos extratos buscou evidenciar a diversidade de metabólitos secundários presentes nas espécies de vegetais aquáticos superiores utilizadas nos experimentos de inibição. Em contrapartida, foi possível avaliar também, a falta de estudos que enfoquem nas características fitoquímicas dessas espécies vegetais.

³ HASLAM, E.. Plant polyphenols. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1989.

5.6.1 Esteróides e triterpenos

As análises qualitativas para esteróides e triterpenos evidenciaram a predominância de esteróides livres nos extratos, como pode ser verificado na Tabela 13 que apresenta também a codificação, utilizada para cada amostra, durante os ensaios fitoquímicos.

Apenas o extrato de *S. montevidensis* apresentou coloração parda após acidificação com H_2SO_4 , caracterizando a presença predominante de triterpenóides pentacíclicos livres (Figura 32). Foi possível verificar em todos os outros extratos, a coloração verde característica de esteróides livres.

Tabela 13 - Resultado das análises qualitativas de esteróides e triterpenos para os oito extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, com as respectivas codificações utilizadas.

Extrato	Codificação	Esteróides e Triterpenos	
		Esteróides livres	Triterpenóides pentacíclicos
<i>Eichhornia azurea</i>	Ei	+	
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	EI	+	
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	L	+	
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (aéreas)	MP	+	
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	MR	+	
<i>Pontederia cordata</i>	P	+	
<i>Sagittaria montevidensis</i>	S		+
<i>Typha domingensis</i>	T	+	

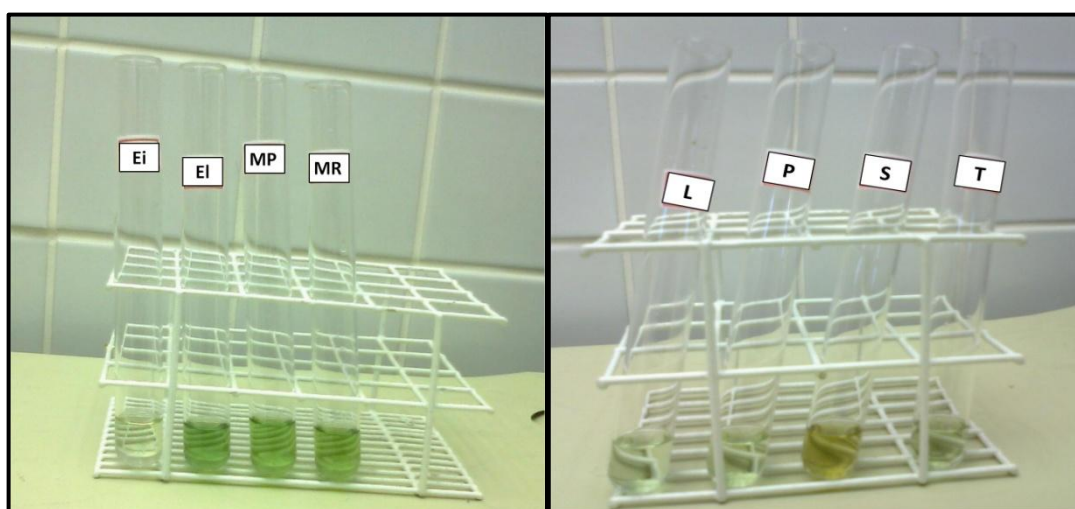


Figura 32 - Coloração obtida após acidificação com H_2SO_4 das soluções clorofórmicas provenientes dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas (Ei: *E. azurea*, EI: *E. cf. acutangula*, MP: *M. cf. aquaticum* partes aéreas, MR: *M. cf. aquaticum* raízes, L: *L. cf. peruviana*, P: *P. cordata*, S: *S. montevidensis*, T: *T. domingensis*)

O resultado positivo para triterpenos no extrato de *S. montevidensis* ocorreu devido à presença de muitos compostos da classe dos terpenos nestes vegetais. De acordo com Xiangwei et al. (2006) a presença de terpenos em espécies de *Sagittaria sp.* faz com que estas apresentem efeitos sobre algumas bactérias patogênicas.

5.6.2 Saponinas

A presença de saponinas foi verificada para os extratos obtidos a partir das espécies *E. cf. acutangula*, *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum* (extrato das raízes). A Figura 33 apresenta as amostras após o processo de neutralização, em que é possível verificar a formação de precipitado, indicativo da presença desta classe de compostos, apenas nos tubos contendo os extratos citados.

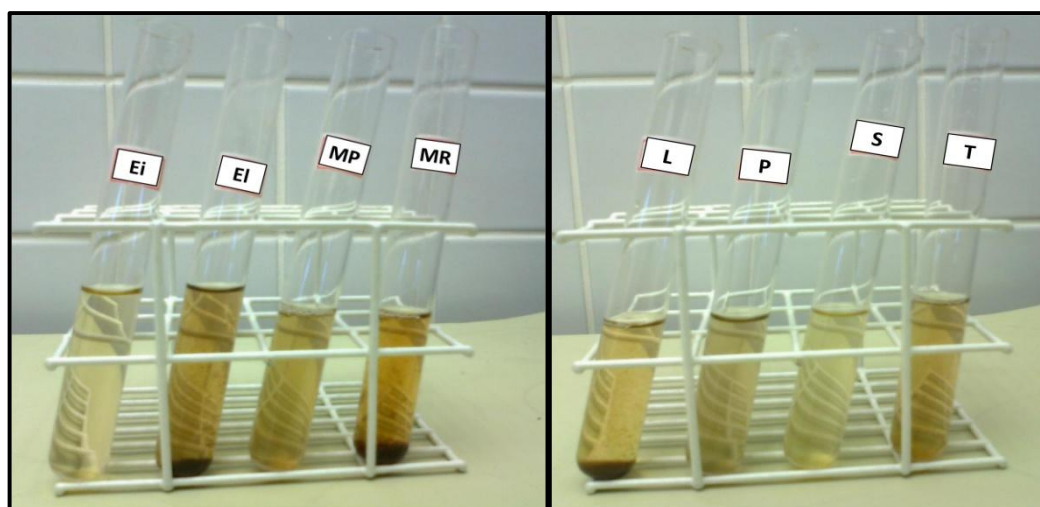


Figura 33 - Amostras obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, após neutralização, durante o teste confirmatório para saponinas (Ei: *E. azurea*, El: *E. cf. acutangula*, MP: *M. cf. aquaticum* partes aéreas, MR: *M. cf. aquaticum* raízes, L: *L. cf. peruviana*, P: *P. cordata*, S: *S. montevidensis*, T: *T. domingensis*)

5.6.3 Taninos e fenóis

As análises para taninos e fenóis indicaram uma diversidade de composição dos extratos em relação a estes compostos, como pode ser observado na Tabela 14 que apresenta os resultados obtidos nesta etapa.

Observou-se a coloração amarela, característica da ausência de fenóis, apenas no extrato obtido de *T. domingensis*. Os extratos de *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum* apresentaram a formação de precipitado escuro azulado indicando taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e os extratos de *E. azurea*, *E. cf. acutangula*, *P. cordata* e *S. montevidensis* apresentaram coloração verde devido a presença de taninos catequéticos como pode ser verificado na Figura 34.

Tabela 14 - Resultado das análises qualitativas de taninos e fenóis para os oito extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, com as respectivas codificações utilizadas

Extrato	Codificação	Fenóis	Taninos pirogálicos hidrolisáveis	Taninos catequéticos
<i>Eichhornia azurea</i>	Ei			+
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	EI			+
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	L		+	
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (aéreas)	MP		+	
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	MR		+	
<i>Pontederia cordata</i>	P			+
<i>Sagittaria montevidensis</i>	S			+
<i>Typha domingensis</i>	T	-	-	-

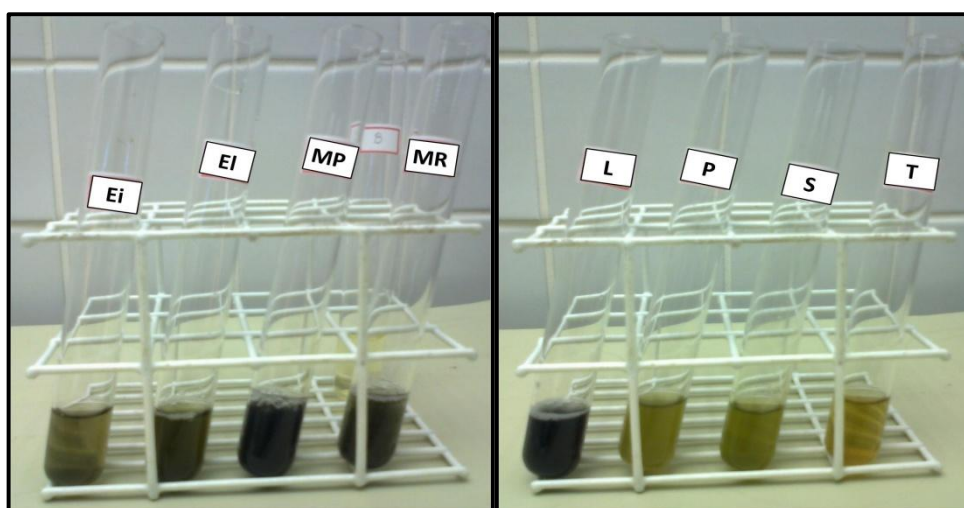


Figura 34 - Amostras obtidas a partir dos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas, após adição de FeCl_3 , durante o teste para taninos e fenóis (Ei: *E. azurea*, EI: *E. cf. acutangula*, MP: *M. cf. aquaticum* partes aéreas, MR: *M. cf. aquaticum* raízes, L: *L. cf. peruviana*, P: *P. cordata*, S: *S. montevidensis*, T: *T. domingensis*)

Os extratos obtidos de *M. cf. aquaticum* apresentaram resultado positivo para taninos hidrolisáveis. De forma semelhante, Saito et al. (1989) verificou a presença desta classe de compostos (ácido gálico) na espécie *Myriophyllum brasiliense*, cujos efeitos inibitórios foram observados às células de *Microcystis aeruginosa*.

Avaliando extratos de duas espécies do gênero *Ludwigia sp.*, Oyedeji, Oziegbe e Taiwo (2011) verificaram efeitos inibitórios a fungos e bactérias, devido a presença predominante de substâncias pertencentes às classes dos taninos e alcalóides, justificando o resultado positivo obtido para taninos no extrato de *L. cf. peruviana*.

O resultado negativo para fenóis, observado para o extrato de *T. domingensis* ocorreu, possivelmente, devido a variáveis como o processo de extração e o solvente utilizado, uma vez que a presença de ácidos fenólicos na estrutura do vegetal foi verificada por Gallardo-Williams et al. (2002).

5.6.4 Flavonóides

Os testes para flavonóides indicaram a presença de flavonas, flavonóis e xantonas para todos os extratos testados. Pôde-se verificar a presença de coloração amarela quando a solução de extrato foi alterada para condições alcalinas, de forma que em pH 11 todas as soluções apresentaram a cor amarela, característica desta classe de compostos como pode ser observado na Figura 35.

De acordo com Harborne, Williams e Wilson (1985), as macrófitas pertencentes à família Cyperaceae apresentam em sua composição elevada quantidade de flavonoides e, especificamente nesse estudo, verificou-se a presença de flavonas para a espécie *Eleocharis brassii*.

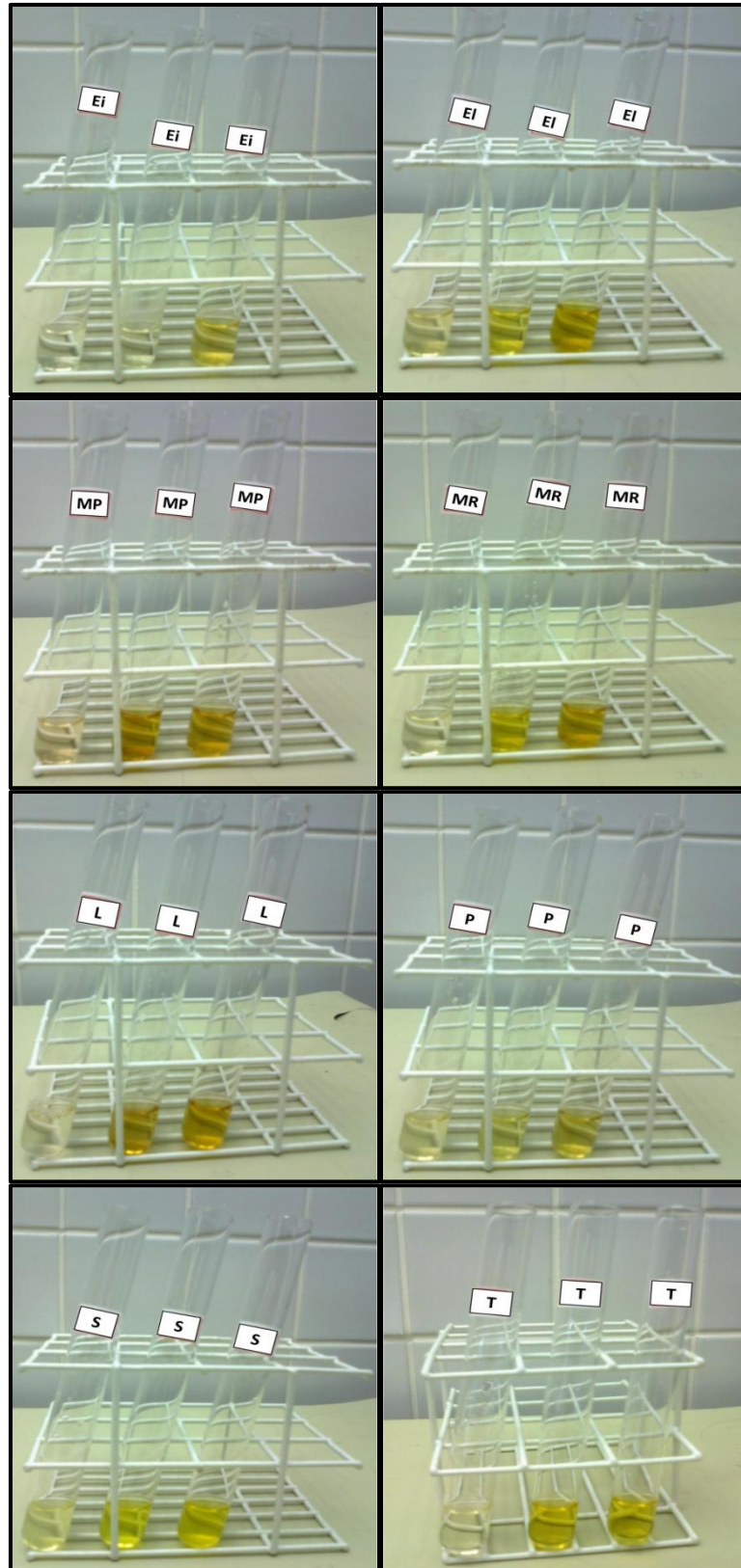


Figura 35 - Soluções de extrato submetidas à pH 3,0; 8,0 e 11,0. Tubos organizados em ordem crescente de pH da esquerda para direita (Ei: *E. azurea*, EI: *E. cf. acutangula*, MP: *M. cf. aquaticum* partes aéreas, MR: *M. cf. aquaticum* raízes, L: *L. cf. peruviana*, P: *P. cordata*, S: *S. montevidensis*, T: *T. domingensis*)

5.6.5 Fenólicos totais

A calibração do método para compostos fenólicos totais (Figura 36) apresentou elevada correlação e linearidade na faixa de concentração testada ($r^2 = 0,9956$; $r = 0,9978$; $p = 0,00001$).

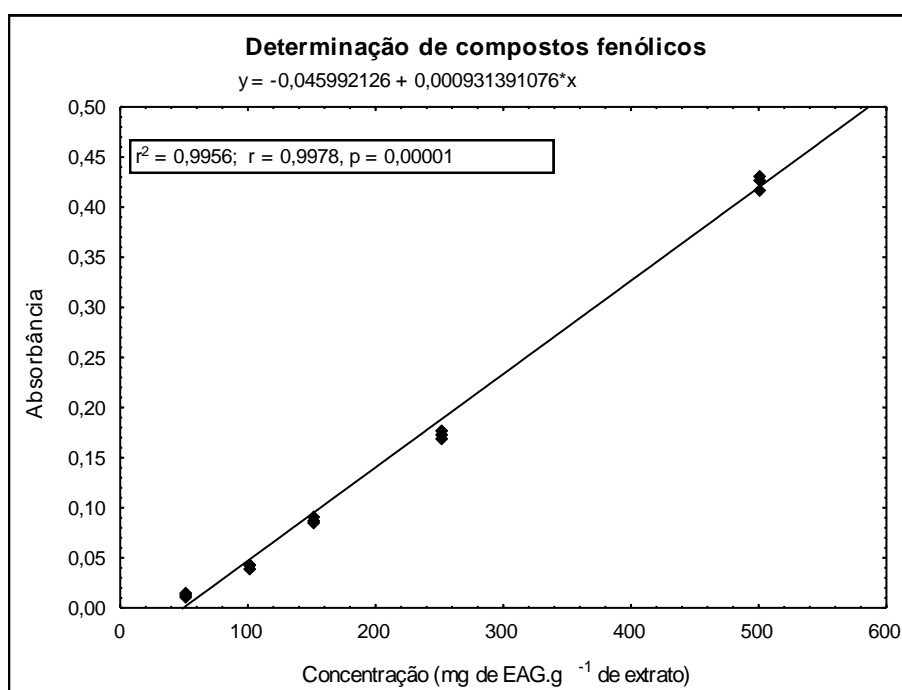


Figura 36 - Correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, e a absorbância

Utilizando a regressão foram determinadas as concentrações destes compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos. A Tabela 15 apresenta os valores médios obtidos com o método para cada amostra.

Verifica-se que, mesmo considerando o desvio padrão, o extrato que apresenta maior concentração de compostos fenólicos é o de *M. cf. aquaticum* (partes aéreas do vegetal) com 405 mg EAG.g⁻¹ de extrato e a menor concentração foi verificada para *S. montevidensis* com 77 mg EAG.g⁻¹.

Tabela 15 - Valores médios (\pm desvio padrão) de compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas (n=3).

Extrato	Fenólicos totais (mg EAG.g ⁻¹ de extrato)
<i>Eichhornia azurea</i>	93 (\pm 8,1)
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	209 (\pm 12,3)
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	311 (\pm 17,1)
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (aéreas)	405 (\pm 15,2)
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	167 (\pm 16,5)
<i>Pontederia cordata</i>	90 (\pm 11,2)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	77 (\pm 7,9)
<i>Typha domingensis</i>	127 (\pm 11,3)

Os maiores valores de compostos fenólicos observados para *M. cf. aquaticum* (partes aéreas), são resultantes da presença de polifenóis nos vegetais pertencentes a este gênero, pois analisando os compostos fitoquímicos de *Myriophyllum spicatum* Nakai et al. (2000) e Leu et al. (2002) verificaram a presença dos ácidos gálico, elágico e pirogálico nos extratos obtidos deste vegetal.

5.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

Os testes de toxicidade foram realizados de forma a verificar os possíveis impactos dos compostos presentes nos extratos vegetais empregados nos experimentos de inibição de *M. aeruginosa* sobre outros organismos de ecossistemas aquáticos dulcícolas. Embora os resultados obtidos com o presente estudo corroborem com os encontrados por outros pesquisadores em relação aos potenciais efeitos inibitórios de macrófitas aquáticas à cianobactéria *M. aeruginosa*, (LEU et al., 2002; LI; HU, 2005; CHENG et al., 2008; ZHU et al., 2010; ZHANG et al., 2011), a aplicação de extratos vegetais em ambientes aquáticos deve ser considerada com cautela, uma vez que os efeitos ecotoxicológicos não são completamente conhecidos.

Neste sentido, a escolha da espécie *Daphnia magna*, para a realização dos testes de toxicidade, foi fundamentada nas características do organismo. Este microcrustáceo, popularmente conhecido como pulga d'água, é um consumidor primário da teia alimentar aquática; apresenta homogeneidade genética, uma vez

que a reprodução ocorre por partenogênese; apresenta sensibilidade à uma grande variedade de compostos nocivos e a utilização deste é internacionalmente reconhecida em testes ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004). Estes fatores contribuem para que os testes de toxicidade apresentem uniformidade e respostas efetivas em relação a compostos nocivos.

A Tabela 16 apresenta os valores percentuais de imobilidade dos organismos testados por concentração de extrato.

Tabela 16 - Valores percentuais de imobilidade para *D. magna*, após exposição por 48 h aos extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas e controles (n=4).

Extrato	Imobilidade em <i>Daphnia magna</i> (%)				
	Controle	DMSO	Concentração (mg.L ⁻¹)		
			0,1	50	500
<i>Eichhornia azurea</i>	0	0	0	0	0
<i>Eleocharis cf. acutangula</i>	0	0	0	0	32,5
<i>Ludwigia cf. peruviana</i>	0	0	0	0	60,0
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (aéreas)	0	0	0	0	100
<i>Miryophyllum cf. aquaticum</i> (raízes)	0	0	0	0	47,5
<i>Pontederia cordata</i>	0	0	0	0	0
<i>Sagittaria montevidensis</i>	0	0	0	100	100
<i>Typha domingensis</i>	0	0	0	0	0

A partir dos testes de imobilidade em *Daphnia magna* foi possível verificar que a maior parte dos extratos apresentou toxicidade na maior concentração utilizada nos testes de inibição (item 5.5). Verificando os valores de imobilidade, é possível observar que o solvente DMSO não causou imobilidade aos organismos testados representando, portanto, reduzida influência nos resultados obtidos para os testes de toxicidade realizados.

O maior efeito tóxico observado ocorreu na aplicação do extrato obtido da espécie *S. montevidensis*, pois em menor concentração (50 mg.L⁻¹) causou imobilidade à 100% dos organismos testados. Por outro lado, os extratos de *E. azurea*, *P. cordata* e *T. domingensis* não causaram efeitos tóxicos mesmo na concentração de 500 mg.L⁻¹.

Os efeitos de baixa toxicidade para *E. azurea*, *P. cordata* e *T. domingensis* já são conhecidos, uma vez que, de acordo com Pott e Pott (2000) estas espécies de vegetais aquáticos possuem estruturas comestíveis de elevado teor de proteínas.

Os efeitos tóxicos verificados para os outros extratos são possivelmente resultantes da presença e concentração dos compostos fitoquímicos, cuja presença foi evidenciada no item 5.6.

A partir da análise preliminar, foram definidas outras concentrações teste (Tabela 17) de maneira a melhor avaliar a resposta dos organismos às substâncias presentes nas macrófitas aquáticas e permitir o cálculo da CE(50) para cada extrato hidroalcoólico testado.

Tabela 17 - Concentrações de extratos de macrófitas aquáticas e da substância de referência (KCI) utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Teste	Concentração em mg.L⁻¹
KCI	570, 660, 700, 750, 840
<i>Eichornia azurea</i>	100, 250, 500, 750, 1000
<i>Eleocharis acutangula</i>	100, 250, 500, 750, 1000
<i>Ludwigia peruviana</i>	100, 250, 500, 750, 1000
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (aéreas)	200, 270, 350, 420, 500
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (raízes)	200, 500, 750, 1000, 1500, 2000
<i>Pontederia cordata</i>	100, 250, 500, 750, 1000
<i>Sagittaria montevidensis</i>	50, 100, 175, 250, 500
<i>Typha domingensis</i>	100, 250, 500, 750, 1000

Os ensaios de sensibilidade, realizados com o cloreto de potássio, apresentaram um coeficiente de variação igual a 2,64% (Figura 37). De acordo com Knie e Lopes (2004), o teste ecotoxicológico pode ser considerado válido se o teste de sensibilidade apresentar coeficiente de variação inferior a 30%. O valor de sensibilidade obtido nos testes e o seu limite de variação (2 vezes o desvio padrão) foram $736,65 \pm 38,86 \text{ mg.L}^{-1}$.

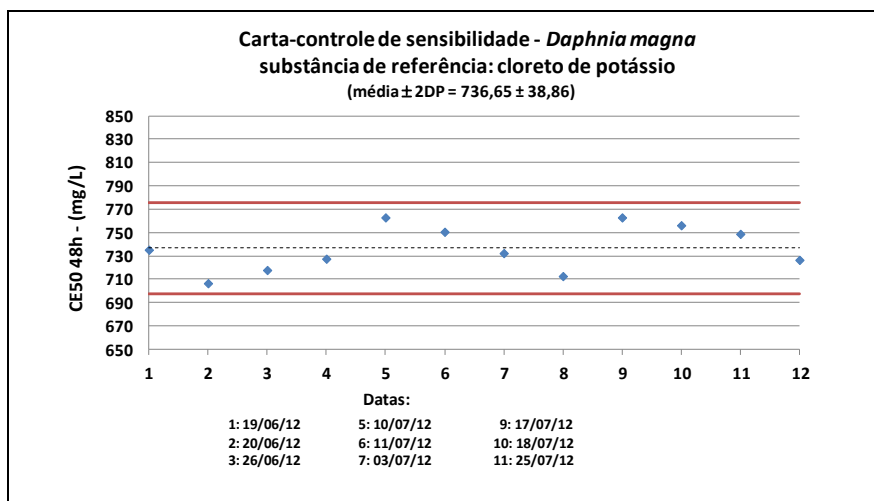


Figura 37 - Carta-control de sensibilidade para ensaios de toxicidade aguda utilizando *Daphnia magna*; substância de referência: KCl

As espécies *Eichornia azurea* e *Typha domingensis* não apresentaram toxicidade aguda em concentrações de até 1000 mg.L⁻¹. Nesta concentração os extratos promoveram a imobilidade em menos de 10% dos organismos testados.

O extrato obtido da espécie *Pontederia cordata*, de maneira semelhante, apresentou reduzida toxicidade, uma vez que causou imobilidade à 20% dos organismos testados na concentração de 1000 mg.L⁻¹.

A Tabela 18 apresenta os valores de CE(50) obtidos para os extratos das espécies de macrófitas aquáticas testadas, cujos valores de imobilidade observados permitiram o cálculo.

Tabela 18 - Valores de CE(50) para os ensaios de toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das espécies de macrófitas aquáticas

Teste	CE(50) em mg.L ⁻¹
<i>Eleocharis acutangula</i>	589,7
<i>Ludwigia peruviana</i>	454,1
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (aéreas)	323,2
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (raízes)	962,9
<i>Sagittaria montevidensis</i>	149,8

Avaliando a CE(50) é possível constatar que a maior toxicidade aguda foi resultante da exposição ao extrato de *Sagittaria montevidensis*, uma vez que o valor foi o menor observado, confirmando os resultados preliminares.

Embora os extratos apresentem um potencial inibitório sobre as florações de cianobactérias, sua aplicação em ambientes dulcícolas naturais deve ser considerada com cautela, devido aos valores de toxicidade observados. Neste sentido os estudos envolvendo a identificação e isolamento dos compostos, responsáveis pelos efeitos inibitórios em cianobactérias, adquirem fundamental importância para a utilização destes com a finalidade de remediação de florações, de maneira a não oferecer riscos a outros organismos aquáticos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de digestão da mucilagem para as células de *Microcystis aeruginosa* auxiliou em uma determinação quantitativa de maior confiabilidade, comprovada pela maior precisão verificada, do número de células durante os testes realizados.

Através dos estudos iniciais observou-se que a cepa BB005 de *Microcystis aeruginosa* foi fortemente influenciada pelas variáveis ambientais como as condições nutricionais do meio e a temperatura. A disponibilidade de nutrientes teve grande efeito sobre as fases de crescimento celular, uma vez que a maior taxa de inoculação apresentou contagens celulares inferiores e menor duração da fase exponencial resultante do esgotamento mais rápido das fontes nutricionais. Mesmo com menores concentrações celulares, o crescimento mais rápido favoreceu a utilização de maior inoculação durante a manutenção dos organismos.

Na otimização do meio de cultura foi possível observar que a condição contendo maior concentração de ferro e fósforo favoreceu o maior crescimento dos cultivos, através da reduzida formação de flocos e aglomerados celulares. Tal característica foi desejável aos testes de inibição, uma vez que nesta condição os organismos ficaram mais expostos aos extratos e os efeitos alelopáticos puderam ser melhor avaliados.

A elevada capacidade de flutuação destes organismos e a consequente formação inadequada de precipitados foram as características responsáveis, neste estudo, por inviabilizar a utilização da clorofila-*a* e as ficobiliproteínas como medidas da biomassa durante os testes de inibição.

A atividade inibitória, verificada nos extratos obtidos, evidencia a possibilidade futura da aplicação do método como uma medida de remediação, uma vez que os testes foram realizados em cultivos que já continham concentração celular de *M. aeruginosa* compatível aos encontrados durante os eventos de floração. O aspecto sólido dos extratos obtidos, o rendimento de até 22,63% (*S. montevidensis*) e a extração com um solvente atóxico (etanol) podem favorecer a utilização destes para a remediação de ambientes afetados.

Os diferentes efeitos inibitórios e o estudo fitoquímico preliminar comprovaram a variabilidade destes compostos, bem como a diversidade de ação destas

substâncias. Foi possível verificar que a maior inibição celular ocorreu com a aplicação do extrato das partes aéreas de *Myriophyllum cf. aquaticum* (até 99,1%). O extrato que ofereceu maior efeito inibitório à produção de microcistina-LR foi o de *Sagittaria montevidensis*, mesmo este apresentando baixo efeito sobre as concentrações celulares (taxa de inibição igual 22,5%).

Verificando os dados de inibição celular e da produção de toxina é possível afirmar que a redução do número de células não é necessariamente acompanhada da diminuição da produção de microcistina-LR, uma vez que o extrato obtido de *Eleocharis cf. acutangula* apresentou elevada inibição celular, porém a produção de toxina pelas células foi maior em relação aos outros testes.

Os efeitos de imobilidade observados para *Daphnia magna* sugerem a necessidade de estudos prévios de toxicidade em extratos para a aplicação em ambientes com floração de *M. aeruginosa*, uma vez que, mesmo os compostos fitoquímicos sendo provenientes de fontes naturais, podem ser prejudiciais a outros organismos vivos, como se pôde observar para o extrato de *S. montevidensis* que apresentou elevada toxicidade.

Os extratos de *Eichhornia azurea*, *Pontederia cordata* e *Typha domingensis*, nos quais o efeito tóxico foi ausente nas concentrações teste, mesmo apresentando inibição celular e à produção de microcistina-LR inicialmente, perderam o efeito quando as células foram expostas à nova fonte de nutrientes durante a reinoculação. Esta característica pode restringir a aplicação em ambientes eutrofizados em que medidas para o controle da entrada de nutrientes não são tomadas.

Comparando os extratos de *L. cf. peruviana* e *M. cf. aquaticum*, que foram mais efetivos na inibição da cepa BB005 de *M. aeruginosa* é possível afirmar que, nas condições testadas, o extrato de *L. cf. peruviana* apresentou maiores vantagens de aplicação já que além de reduzir as concentrações celulares, restringir a produção de toxina e apresentar efeito bactericida, causou imobilidade a 60% dos organismos nos testes com *D. magna* na concentração de 500 mg.L⁻¹, enquanto que 100% foram imobilizados com o extrato das partes aéreas de *M. cf. aquaticum*.

Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de investigações fitoquímicas e toxicológicas mais detalhadas no sentido de melhor identificar as substâncias ativas no controle de florações, de forma a potencializar a ação destas e minimizar seus efeitos tóxicos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros, poderiam ser testadas concentrações intermediárias, de maneira a permitir o cálculo das quantidades de extrato mais efetivas no controle das cianobactérias.

Os extratos de macrófitas aquáticas poderiam ser testados em relação aos efeitos inibitórios em outras espécies, utilizando cultivos contendo mais de uma cepa de cianobactérias, simulando a interação entre estes microrganismos verificada no ambiente natural. Os experimentos de inibição poderiam também ser conduzidos em meios de cultura não otimizados, de modo a refletir condições mais próximas das ambientais.

A produção de compostos efetivos no controle de florações poderia ser estimulada, através da obtenção de extratos provenientes de macrófitas aquáticas inseridas em condições de interação com a cianobactéria a ser estudada, uma vez que o mecanismo de alelopatia provavelmente seria responsável pela produção de maiores concentrações de compostos com efeito inibitório. Os experimentos poderiam ser conduzidos utilizando macrófitas aquáticas vivas, verificando a concentração celular e simultânea liberação de substâncias provenientes do metabolismo vegetal para a coluna d'água.

A separação cromatográfica, dos componentes presentes nos extratos, poderia auxiliar na identificação dos compostos ou do conjunto de compostos responsáveis por inibir as células e/ou a produção de toxinas, bem como auxiliar na diminuição da toxicidade destes em relação a outros organismos.

Neste estudo os extratos foram adicionados aos cultivos no momento em que a concentração celular era compatível a encontrada em florações, conferindo ao experimento uma característica de remediação. Em estudos futuros uma característica que poderia ser verificada é o caráter preventivo destes extratos, através da adição destes em cultivos que ainda não atingiram elevadas concentrações celulares.

REFERÊNCIAS

AHMED, F.; SELIM, M. S. T.; SHILPI, J. A. Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 473-475, 2005. ISSN 0367-326X.

ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M.. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 61, n. 1, p. 4237-4247.

AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V.; FARIA, A. D.; ANDERSON, L. O.; AONA, L. Y. S.. **Guia de campo para plantas aquáticas e palustres do estado de São Paulo**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2008. 452 p. ISBN 978-85-86699-64-1.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L. *Sphaerocavum brasiliense* a new planktic genus and species of cyanobacteria from reservoirs of São Paulo state, Brazil. **Algological Studies**, v. 109, p. 79-92, 2003.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina Online**, v. 1, n. 3, p. 1-22, 1998.

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. 181-182, p. 441-446, 2002. ISSN 0300-483X.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.

BERGMAN, B.; GALLON, J. R.; RAI, A. N.; STAL, L. J.. N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 139-185, 1997. ISSN 1574-6976.

BEZERRA, D. A. C.. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Patos, 2008. 63 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

BIANCHINI JUNIOR, I.. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M (Ed.). **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: EDUEM, 2003. 341 p. ISBN 978-85-7628-191-7.

BINI, L. M.; THOMAZ, S. M.; MURPHY, K. J.; CAMARGO, A. F. M.. Aquatic macrophyte distribution in relation to water and sediment conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 415, p. 147-154, 1999.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; PINTO, E. Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 209-216, 2011.

BODEMER, U. Variability of phycobiliproteins in cyanobacteria detected by delayed fluorescence excitation spectroscopy and its relevance for determination of phytoplankton composition of natural water samples. **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 10, p. 1147-1162, 2004.

BRASIL. **Normas de qualidade de água para consumo humano**. FUNASA. Brasília, DF: Diário Oficial da União República Federativa do Brasil. Portaria n°. 518 de março 2004.

_____. **Normas de qualidade de água para consumo humano**. FUNASA. Brasília, DF: Diário Oficial da União República Federativa do Brasil. Portaria n°. 2914 de dezembro 2011.

BROOKES, J. D.; CAREY, C. C. Resilience to Blooms. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 46-47, 2011.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992. ISSN 1365-2672.

_____. The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, p. 78-86, 1994.

_____. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 7, n. 5, p. 1393-1407, 2001. ISSN 1080-7039.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K.. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663, 2001. ISSN 00916765.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p. 519-535.

CHEN, J.; ZHANG, H.; HAN, Z.; YE, J.; LIU, Z.. The influence of aquatic macrophytes on *Microcystis aeruginosa* growth. **Ecological Engineering**, v. 42, n. 0, p. 130-133, 2012. ISSN 0925-8574.

CHENG, W.; CHANG, X.; DONG, H.; LI, D.; LIU, J.. Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, n. 6, p. 2595-2603, 2008. ISSN 1872-2032.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. 400 p. ISBN 0-419-23930-8.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B. M.. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 245-260, 2011.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; PACIFICO, S.. Chemical constituents of the aquatic plant *Schoenoplectus lacustris* : evaluation of phytotoxic effects on the green alga *Selenastrum capricornutum*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 1, p. 81-96, 2006. ISSN 0098-0331.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. **Florações de algas e de cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**. São Carlos: LDiBe Ltda., 2010. ISBN 978-85-62324-02-4.

DZIGA, D.; SUDA, M.; BIALCZYK, J.; CZAJA-PROKOP, U.; LECHOWSKI, Z.. The alteration of *Microcystis aeruginosa* biomass and dissolved microcystin-LR concentration following exposure to plant-producing phenols. **Environmental Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 341-346, 2007. ISSN 1522-7278.

EDWARDS, C.; LAWTON, L. A.. Assessment of microcystin purity using charged aerosol detection. **Journal of Chromatography**, v. 1217, n. 32, p. 5233-5238, 2010.

EL-SHEHAWY, R.; GOROKHOVA, E.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F.; DEL CAMPO, F. F.. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1420-1429, 2012. ISSN 0043-1354.

FALCONER, I. R. An Overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 5-12, 1999. ISSN 1522-7278.

_____. **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins**. CRC Press, 2005. ISBN 9780415318792.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p.165-182.

FATMA, H. T. Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental Stress on Its Yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509-515, 2009. ISSN 0007-4861.

FERRÃO-FILHO, A. D. S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 225-228, 2009.

GALLARDO-WILLIAMS, M. T.; GEIGER, C. L.; PIDALA, J. A.; MARTIN, D. F.. Essential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.). **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 305-308, 2002. ISSN 0031-9422.

GLEICK, P. H. Global Freshwater Resources: Soft-Path Solutions for the 21st Century. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1524-1528, 2003.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K.. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) De Bréb. **Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 15, p. 796-804, 1964.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. (Ed.). **Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. p.289-311.

GROSS, E. Allelopathy of Aquatic Autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, p. 313-339, 2003. ISSN 0735-2689.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; WILSON, K. L.. Flavonoids in leaves and inflorescences of australian Cyperaceae. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 751-766, 1985.

HASLER, A. D.; JONES, E.. Demonstration of the antagonistic action of large aquatic plants on algae and rotifers. **Ecology**, v. 30, n. 3, p. 359-364, 1949.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H.. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p. 765-791.

HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1995. ISBN 9780521316873.

HORNES, M.; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I.. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 364-371, 2010. ISSN 0101-2061.

HOTLOS, H. Quantity and availability of freshwater resources: The world – Europe – Poland. **Environment Protection Engineering**, v. 34, n. 2, p. 67-77, 2008.

HU, H.; HONG, Y. Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes — A review. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v. 2, n. 4, p. 421-438, 2008. ISSN 1673-7415.

IMAI, H.; CHANG, K.; KUSABA, M.; NAKANO, S.. Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 2, p. 171-178, 2009.

JANCULA, D.; MARSALEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. **Chemosphere**, v. 85, n. 9, p. 1415-1422, 2011. ISSN 0045-6535.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H.. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 7, n. 2, p. 127-136, 2008. ISSN 1568-9883.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. D.; MELO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. . Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998. ISSN 0028-4793.

KALFF, J.. **Limnology: inland water ecosystems**. New Jersey: Prentice Hall, 2003. 592 p. ISBN 0-130-33775-7.

KARDINAAL, W. E.; VISSER, P. M.. Dynamics of cyanobacterial toxins: sources of variability in microcystin concentrations. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M. (Ed.). **Harmful cyanobacteria**. Amsterdam: Springer, 2005, p. 41-63. ISBN 1-4020-3022-3.

KATASE, T.. Stereoisomerization of p-coumaric and ferulic acids during their incubation in peat soil extract solution by exposure to fluorescent light. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 421-427, 1981.

KITA, K. K.; SOUZA, M. C.. Levantamento florístico e fitofisionomia da lagoa Figueira e seu entorno, planície alagável do alto rio Paraná, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 145-155, 2003.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004. ISBN 85-87391-05.

LEU, E.; KRIEGER-LISZKAY, A.; GOUSSIAS, C.; GROSS, E. M.. Polyphenolic Allelochemicals from the Aquatic Angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit Photosystem II. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2011-2018, 2002.

LI, F. M.; HU, H. Y. Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6545-6553, 2005.

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.

LIOTENBERG, S.; CAMPBELL, D.; RIPPKA, R.; HOUMARD, J.; MARSAC, N. T.. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. **Microbiology**, v. 142, p. 611-622, 1996.

LIU, R. H.. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S.. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MATOS, F. J. A.. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 148 p., 2009.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229 - 246, 2009.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MULDERIJ, G.; SMOLDERS, A. J. P.; VAN DONK, E. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. **Freshwater Biology**, v. 51, n. 3, p. 554-561, 2006. ISSN 1365-2427.

MULDERIJ, G.; MAU, B.; VAN DONK, E.; GROSS, E.. Allelopathic activity of *Stratiotes aloides* on phytoplankton—towards identification of allelopathic substances. **Hydrobiologia**, v. 584, n. 1, p. 89-100, 2007. ISSN 0018-8158.

NAKAI, S.; INOUE, Y.; HOSOMI, M.; MURAKAMI, A.. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 47-53, 1999. ISSN 0273-1223.

_____. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 34, n. 11, p. 3026-3032, 2000. ISSN 0043-1354.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H.. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Cancer Research Clinical Oncology**, v. 118, p. 420-424, 1992.

OKI, T.; KANAE, S. Global Hydrological Cycles and World Water Resources. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1068-1072, 2006.

OLIVEIRA, J. A. **Remoção de microcistina em águas provenientes de reservatório eutrofizado associando técnicas de clarificação, pré-oxidação com permanganato de potássio, adsorção em carvão ativado e pós-cloração**. São Carlos, 2009. 191 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

OLIVER, R. L.; GANF, G. G.. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 176-178.

OU, M. M.; WANG, Y.; CAI, W. M. Physiological and Biochemical Changes in *Microcystis aeruginosa* Kutz. in Phosphorus Limitation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 692-702, 2005. ISSN 1744-7909.

OYEDEJI, O.; OZIEGBE, M.; TAIWO, F. O. Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of crude extracts from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. and *Ludwigia decurrens* Walter. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 7, p. 1192-1199, 2011. ISSN 1996-0875.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1349-1363, 2012. ISSN 0043-1354.

POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 406-424, 2008.

POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perifíton: aspectos ecológicos e metodológicos**. São Carlos: RiMa, 2003. 134 p.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 404 p. ISBN 85-7383-091-3.

REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G. H. M. Enumeration of natural *Microcystis* populations. **British Phycological Journal**, v. 13, n. 3, p. 269-277, 1978. ISSN 0007-1617.

REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G. H. M.; CMIECH, H. A.; LEEDALE, G. F.. On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis Aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 293, n. 1068, p. 419-477, 1981.

RIBEIRO, J. P. N.. **Fatores condicionantes da flora marginal e aquática do estuário do rio Massaguaçu (Caraguatatuba – SP)**. São Carlos, 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos.

SAITO, K.; MATSUMOTO, M.; SEKINE, T.; MURAKOSHI, I.; MORISAKI, N.; IWASAKI, S.. Inhibitory Substances from *Myriophyllum brasiliense* on Growth of Blue-Green Algae. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1221-1226, 1989. ISSN 0163-3864.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R.. **Manual ilustrado para identificação e**

contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência, 58 p., 2006.

SANTOS, R. I.. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento.** 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p.403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento.** 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p. 615-656.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L.. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento.** 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p. 711-740.

SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; HORA, R. C.; SOUZA, P. R.. **Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região.** Campo Grande: Ed. UFMS, 1999. 160 p.

SILVA, C. S. P.. **Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais.** Piracicaba, 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

SILVA, S. S. L.. **Caracterização ecológica e estrutural de macrófitas em reservatórios no estado de Pernambuco.** Recife, 2011. 108 p. Tese (Doutorado em Botânica). Departamento de Biologia / Área de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V.. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento.** 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p.467-495.

SIVONEM, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.** London: E & FN Spon, 1999. ISBN 0-419-23930-8.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae)

under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 1-10, 2004. ISSN 0166-445X.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007. ISSN 0100-4042.

SOUZA FILHO, A. P. S.. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 607-610, 2006.

TAKENAKA, R. A. **Avaliação da toxicidade de *Microcystis aeruginosa* e de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê, SP.** São Carlos, 2007. 362 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

TANAKA, C. M. A.; RADKE, V. S. C. O.; SILVA, C. C.; NAKAMURA, C. V.; OLIVEIRA, P. L.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.. Abietatrienes diterpenoids from *Sagittaria montevidensis* SSP *Montevidensis*. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 30-32, 2010.

UENO, Y.; Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Watanabe, M. F.; Park, H. D.; Chen, G. C.; Chen, G.; Yu, S. Z.. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1317-1321, 1996.

VÉZIE, C.; RAPALA, J.; VAITOMAA, J.; SEITSONEN, J.; SIVONEN, K.. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. **Microbial Ecology**, n. 43, p. 443-454, 2002.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Flavonoids extraction from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith leaves using different procedures. **Eclética Química**, v. 35, n. 1, p. 35-40, 2010.

VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T.. Fate of allelochemicals in the soil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 351-357, 1997. ISSN 0103-8478.

VISSER, P. M.; IBELINGS, B. W.; MUR, L. R.; WALSBY, A. E.. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*—features explaining its success and measures for its control. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M. (Ed.). **Harmful cyanobacteria**. Amsterdam: Springer, 2005, p.109-142. (Aquatic ecology series). ISBN 1-4020-3022-3.

WATANABE, M. F.; OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1342-1344, 1985.

WESTRICK, J. A.; SZLAG, D. C.; SOUTHWELL, B. J.; SINCLAIR, J.. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1705-1714, 2010. ISSN 1618-2642.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Kluwer Academic, 2000. ISBN 9780792347354.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality**. Geneva: World Health Organization 1998.

WILHELM, S. W. Ecology of iron-limited cyanobacteria: a review of physiological responses and implications for aquatic systems. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, p. 295-303, 1995.

WU, Y.; LIU, J.; YANG, L.; CHEN, H.; ZHANG, S.; ZHAO, H.; ZHANG, N.. Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 604-615, 2011. ISSN 1462-2920.

XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; BRUNKOW, R. F.. Eutrofização. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Ed.). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR, 2005. p. 391-408.

XIANG-CAN, J.; ZHAO-SHENG, C.; WEN-LI, Y.; XIAO-ZHEN, H.. Influence of phosphorus on *Microcystis* growth and the changes of other environmental factors. **Journal of Environmental Sciences**, v. 17, n. 6, p. 937-941, 2005. ISSN 1001-0742.

XIANGWEI, Z.; XIAODONG, W.; PENG, N.; YANG, Z.; JIAKUAN, C.. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Sagittaria trifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 5, p. 520-522, 2006. ISSN 0009-3130.

XIE, P.; LIU, J. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms - a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. **TheScientificWorld**, v. 1, p. 337-356, 2001. ISSN 1532-2246.

YANG, Z.; KONG, F. Formation of large colonies: a defense mechanism of *Microcystis aeruginosa* under continuous grazing pressure by flagellate *Ochromonas* sp.. **Journal of Limnology**, v. 1, n. 71, p. 61-66, 2012.

YI, Y. L.; LEI, Y.; YIN, Y.; ZHANG, H.; WANG, G.. The antialgal activity of 40 medicinal plants against *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-10, 2011. ISSN 0921-8971.

ZHANG, M.; SHI, X.; YU, Y.; KONG, F.. The acclimative changes in photochemistry after colony formation of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 524-532, 2011. ISSN 1529-8817.

ZHANG, T.T.; WANG, L. L.; HE, Z. X.; ZHANG, D.. Growth inhibition and biochemical changes of cyanobacteria induced by emergent macrophyte *Thalia dealbata* roots. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 88-94, 2011. ISSN 0305-1978.

ZHU, J.; LIU, B.; WANG, J.; GAO, Y.; WU, Z.. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 196-203, 2010. ISSN 0166-445X.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5^a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. p. 577-614.