

ANDERSON LOURENÇÃO

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*
KÜTZING (KÜTZING) PRODUTORA DE MICROCISTINA, EXPOSTA
AOS EXTRATOS DE *PISTIA STRATIOTES* L.**

ASSIS

2017

ANDERSON LOURENÇÃO

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*
KÜTZING (KÜTZING) PRODUTORA DE MICROCISTINA, EXPOSTA
AOS EXTRATOS DE *PISTIA STRATIOTES* L.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

Bolsista: CAPES

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

L892r Lourenção, Anderson
Respostas fisiológicas de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (Kützinger) produtora de microcistina, exposta aos extratos de *Pistia stratiotes* L. / Anderson Lourenção. Assis, 2017.
52 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Dr Regildo Márcio Gonçalves da Silva
Co-Orientadora: Dr^a Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

1. Cianobacteria. 2. Alelopatia. 3. Fenóis. 4. Flavonoides.
I. Título.

CDD 581.5

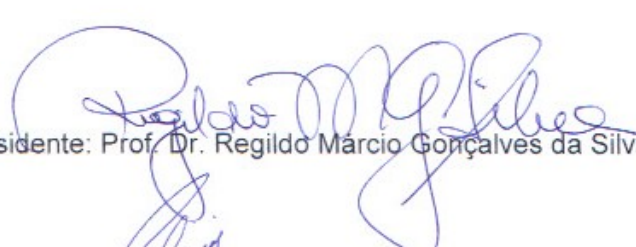
Anderson Lourenção

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE "MICROCYSTIS
AERUGINOSA KÜTZING" (KÜTZING) PRODUTORA DE
MICROCISTINA, EXPOSTA AOS EXTRATOS DE "PISTIA
STRATIOTES" L.

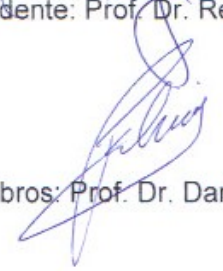
Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP/Assis para a
obtenção do título de Mestrado Acadêmico em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 17/02/2017

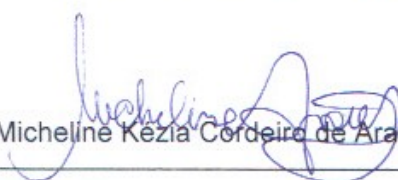
COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva - UNESP/ASSIS



Membros: Prof. Dr. Dário Abel Palmieri - UNESP/ASSIS



Profa. Dra. Micheline Kézia Cordeiro de Araújo - USP/PIRACICABA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todas as bênçãos e oportunidades.

À minha família, que sempre me apoiou em tudo e não poupou esforços para que meu sonho se realizasse.

Ao meu orientador, o professor Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, por seus ensinamentos, por toda a atenção, compreensão, disponibilidade e prontidão em ajudar.

À minha coorientadora, a professora Dr^a. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, por toda sua contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de laboratório, pela troca de experiências e ensinamentos.

Aos funcionários da universidade, Natália, Gilberto, Allan, Amabile, Rose e Dani, pela amizade, ajuda e companhia.

Aos meus amigos, que sempre me encorajaram e sempre estiveram ao meu lado.

À agência de fomento CAPES.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada,
não existirão resultados.”
(Mahatma Gandhi, 1869 – 1948)*

LOURENCAO, Anderson. **RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* KÜTZING (KÜTZING) PRODUTORA DE MICROCISTINA, EXPOSTA AOS EXTRATOS DE *PISTIA STRATIOTES* L.** 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

RESUMO

Os estudos de plantas candidatas a fornecedoras de compostos algicidas tornam-se de suma importância, visto o impacto das cianotoxinas frente à saúde das populações assim como a possível contaminação de alimentos e do ambiente. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as respostas fisiológicas de *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (cepa BCCUSP232), contra ação algicida dos extratos aquoso e etanólico de *Pistia stratiotes* L. Para tanto, uma seleção de compostos e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foram analisadas, além de determinar o conteúdo polifenólico presente nos extratos. A exposição da *M. aeruginosa* as diferentes concentrações dos extratos (100, 250 e 500 mg/L) resultou em uma redução significativa na densidade celular da cepa. Essa redução pôde ser observada para as diferentes concentrações do extrato aquoso a partir do 2º dia de exposição, sendo estes diferentes estatisticamente quando comparados com o controle. Para o extrato etanólico, perfil semelhante foi observado, sendo que para a maior concentração utilizada (500 mg/L), a densidade celular foi reduzida a 0 a partir do 4º dia de exposição. Além disso, *P. stratiotes* reduziu a concentração de proteínas totais, aumentou a produção interna de peróxido de hidrogênio e malondialdeído nas cianobactérias, e no geral a produção da peroxidase, catalase e glutathione-S-transferase relacionadas com o metabolismo de defesa antioxidante da cianobactéria. Houve um declínio acentuado nos níveis da superóxido dismutase (SOD), causando assim a acumulação de radicais e peróxidos livres, sugerindo que este seja o fator mais importante relacionado à ação algicida dos extratos de *P. stratiotes*. Não foi possível verificar atividade pró-oxidativa para ambos os extratos no teste de degradação da albumina sérica bovina. Para os resultados da determinação de fenóis e flavonoides totais, verificou-se para o extrato etanólico concentração de 93.36 µg para o teste de polifenóis totais e 217.33 µg para o teste de flavonoides. Já para o extrato aquoso foi verificado 5.19 µg para o teste de fenóis totais e 11.02 µg para o teste de flavonoides. Diante destes resultados foi possível concluir que *P. stratiotes* apresenta potencial para controle de populações de cianobactérias, sugerindo que esta ação pode estar correlacionada com o estresse oxidativo causado à mesma.

Palavras-chaves: Cianobactéria. Alelopatia. Fenóis. Flavonoides.

LOURENCAO, Anderson. **PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* KÜTZING (KÜTZING) MICROCYSTIN PRODUTOR'S, EXPOSED TO EXTRACTS OF *PISTIA STRATIOTES* L.** 2017. 44 f. Dissertation (Master of Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

ABSTRACT

Studies of candidate plants to suppliers of algaecides compounds become very important, as the impact of cyanotoxins front of the health of populations as well the possible contamination of food and the environment. Therefore, this study aimed to evaluate the physiological responses of *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (BCCUSP232 strain) against algaecide action of *Pistia stratiotes* L. extracts. Therefore, a selection of compounds and enzymes related to oxidative stress were analyzed, in addition to also determine the content polyphenol present in the extracts. *M. aeruginosa* exposure to different concentrations of the extracts (100, 250 and 500 mg L⁻¹) resulted in a significant reduction in cell density of the strain. This reduction was observed for the different concentrations of the aqueous extract from the 2nd day of exposure, which are statistically different when compared with control. To the ethanolic extract, a similar profile was observed, and for the highest concentration used (500 mg L⁻¹), cell density was reduced to 0 from the 4th day of exposure. In addition, *P. stratiotes* reduced total protein concentration, increased internal production of hydrogen peroxide and malondialdehyde in cyanobacteria, and not the production of peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase related to the antioxidant defense metabolism of cyanobacteria. There was a marked decline in the levels of superoxide dismutase (SOD), thus causing an accumulation of free radicals and peroxides, suggesting that this most important factor related to the algicidal action of extracts of *P. stratiotes*. Could not verify pro-oxidative activity of both extracts in the bovine serum albumin degradation test. For the results of the determination of total phenols and flavonoids, it was found for the ethanol extract concentration of 93.36 ug to total polyphenols test and 217.33 ug for flavonoid test. As for the aqueous extract was found 5.19 ug for total phenols test and 11.02 ug for flavonoid test. In view of these results it was concluded that *P. stratiotes* has the potential to control populations of cyanobacteria, suggesting that this action can be correlated with oxidative stress it.

Keywords: Cyanobacteria. Allelopathy. Phenols. Flavonoids.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO ÚNICO	18
RESUMO.....	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Material vegetal e preparo dos extratos	22
2.2 Avaliação do potencial Algicida e / ou Algistático.....	22
2.3 Avaliação do mecanismo de ação dos extratos de <i>P. Stratiotes</i> em <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP232.....	23
2.3.1 Peroxidação lipídica.....	23
2.3.2 Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio interno (H ₂ O ₂).....	23
2.3.3 Determinação de proteínas totais.....	24
2.3.4 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	24
2.3.5 Análises estatísticas.....	25
2.4 Quantificação de fenóis e flavonoides totais.....	26
2.5 Degradação oxidativa da albumina sérica bovina.....	26
3 RESULTADOS.....	27
3.1 Bioensaios com <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	27
3.2 Determinação da Peroxidação Lipídica	29
3.3 Determinação de Peróxido Hidrogênio (H ₂ O ₂)	31
3.4 Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes.....	33
3.5 Determinação de Fenóis e Flavonoides	39
3.6 Avaliação da atividade pró-oxidativa pela degradação da albumina sérica bovina (BSA).....	40
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
CONCLUSÕES GERAIS	51

INTRODUÇÃO GERAL

1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias também chamadas de cianofíceas ou algas azuis são micro-organismos procarióticos, autótrofos fotossintetizantes, fixadores de nitrogênio atmosférico, apresentando clorofila a e b, porém suas células não possuem cloroplastos como nos vegetais superiores (SANCHES et al., 2012). As cianobactérias podem ser encontradas na forma unicelular (por exemplo, gêneros *Synechococcus* e *Aphanothece*), em colônias unicelulares (por exemplo, gêneros *Microcystis*, *Gomphospheria* e *Merismopedium*) e em filamentos (por exemplo, gêneros *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Nostoc*) (MORENO et al., 2005; FERNANDES et al., 2009).

Ontologicamente, as cianobactérias são indivíduos antigos e os seus fósseis são datados do período pré-cambriano (CARMICHAEL, 1994). Esta existência se deve principalmente à flexibilidade genotípica e fenotípica, somado as adaptações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas, que garantiram a estes organismos sua perpetuação e distribuição em diversos ambientes terrestres, aquáticos e na interface úmida da terra com o ar (KAEBERNICK e NEILAN, 2001; STEWART et al., 2006). Esta grande flexibilidade também permite isolá-las e mantê-las em cultivos com certa facilidade (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

As cianobactérias possuem grande importância econômica. Alguns gêneros são diazotróficos (fixadores de nitrogênio molecular) e contribuem para a fertilização da água e do solo (RAI, 1990). Algumas espécies são usadas na indústria alimentícia por apresentarem alto valor nutricional (BOROWITSKA e BOROWITSKA, 1988). Elas também são uma rica fonte de novas substâncias com potencial interesse farmacêutico, já que produzem uma grande variedade de metabólitos secundários com atividade biológica (PATTERSON et al., 1994).

Em condições ambientais favoráveis às cianobactérias, estas tem seu crescimento populacional elevado, seja de uma espécie ou várias, sendo este evento denominado de floração ou “bloom” (CARMICHAEL, 2001).

2 CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CIANOTOXINAS

Vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações produzem toxinas, estas são denominadas de cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992). Tais organismos constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos e, embora ainda não estejam devidamente

esclarecidas as causas da produção dessas toxinas, têm-se atribuído várias funções a esses compostos como mecanismo de defesa (herbivoria), auxílio na melhor captação da luz solar e como moléculas de sinalização que colaboram na comunicação entre as cianobactérias (CARMICHAEL, 1992; CHORUS e BARTRAM, 1999; LYCK, 2004). De acordo com sua ação farmacológica, as cianotoxinas são classificadas como hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e irritantes gastrointestinais (KAEBERNICK e NEILAN, 2001, BRIAND et al., 2003; FALCONER, 2008). Cianotoxinas são diferentes em estrutura química e toxicidade, são produzidas no interior das células de cianobactérias, e sua liberação ocorre durante a vida da célula, mas na maior parte, após a morte das células através de um fluxo passivo para fora do conteúdo celular ou quando a célula é lisada (CARMICHAEL, 1992; LAM et al., 1995; CHORUS, 2001; BRIAND et al., 2003; HAIDER et al., 2003; PEARSON et al., 2004; DE LA CRUZ et al., 2011). A liberação súbita de cianotoxinas na água circundante pode apresentar um risco para os animais e os seres humanos que utilizam a água, especialmente quando usadas como fonte de água potável (FALCONER, 1998; OBERHOLSTER et al., 2004). Cianotoxinas podem causar doença em humanos, principalmente após a ingestão por via oral, através da água potável ou o consumo de alimentos que poderiam ter acumulado as mesmas, ou até mesmo a morte quando exposta através de hemodiálise (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998; KUIPER-GOODMAN et al., 1999; CARMICHAEL et al., 2001; ZHOU et al., 2002; SVIRČEV et al., 2007; SVIRČEV et al., 2009).

Hepatotoxicose e Neurotoxicose são as síndromes mais comuns causados pela ingestão destas toxinas (HAIDER et al., 2003). Após contato agudo com água de fontes que contenham florações de cianobactérias pode ocorrer dor abdominal, vômitos, diarreia, fraqueza, irritação da pele e membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta, ataques de asma, tremores musculares, náuseas, formigamento na ponta dos dedos das mãos e pés, visão turva, dor de cabeça, tonturas, febre, hipóxia, cianose, paralisia respiratória ou cardíaca, resultando em morte (CHORUS e BARTRAM, 1999; SVIRČEV et al., 2009). Devido a isto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma orientação onde, por exemplo, o nível máximo aceitável de microcistina-LR em água potável é de 1µg/L (WHO, 2004), sendo este mesmo limite o estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2004).

Diante disso, algumas medidas são utilizadas para mitigar os efeitos do crescimento de cianobactérias e seus danos ao meio ambiente, entre estas compreendem às físicas e as químicas. As físicas são a filtração, a separação por centrifuga, ultrassom e radiação UV, já os tratamentos químicos utilizam sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio (DRABKOVA et al.,

2007; OU et al., 2012). Outra alternativa viável é o controle biológico, que utiliza a introdução de organismos previamente selecionados como peixes e zooplânctons (KOTOPOULIS et al., 2009; LIANG e NAN, 2009). Entretanto essas medidas apresentam sucesso limitado, pois são muito dispendiosas, sendo utilizadas apenas como soluções emergenciais, demonstrando assim a necessidade de novas pesquisas para a elaboração de novas técnicas menos onerosas e mais eficazes, que gerem menor impacto ambiental e maior durabilidade, refletindo também na sustentabilidade (FERRIER et al., 2005).

3 CONTROLE DE CIANOBACTÉRIA POR MEIO DE COMPOSTOS NATURAIS

O controle de poluentes ambientais de origem sintética e/ou natural pode ser realizado por meio de associação com compostos de origem vegetal e animal. No caso da utilização de plantas ou derivados destas, este processo é denominado de fitorremediação. Esta tecnologia emergente pôde nas ultimas décadas oferecer uma alternativa mais rentável (econômica), não intrusiva e segura para técnicas convencionais de despoluição de água (RASKIN e ENSLEY, 2000; TERRY e BANUELOS, 2000; GLICK, 2010). Dentro deste conceito, diversos estudos vem mostrando as possíveis aplicações de plantas nesta área, o que inclui a detoxificação de metais, remoção de produtos de cuidado pessoal, remédios, tratamento de esgoto e ainda, a inibição do crescimento de algas (ZIMMELS et al., 2006; TEWARI et al., 2008; ZHU et al., 2014; PUTRA et al., 2015; LIN e LI, 2016).

Diante disso, uma gama de metabolitos secundários (aleloquímicos) de origem vegetal vem sendo estudada com a finalidade de fitorremediação. Plantas aquáticas vêm demonstrando a presença de compostos com efeito inibitório sobre o crescimento de algas, e isto vem representando um novo conceito no desenvolvimento de tecnologias de controle destes organismos. Esta utilização de aleloquímicos compreende uma tecnologia biológica algicida cujas vantagens incluem alta eficácia, baixo custo, materiais naturais e facilmente obtidos e uma ausência de poluição secundária (YU et al., 1992; NAKAI et al., 2000; VYVYAN, 2002; GROSS, 2003; BAUER et al., 2009; GROSS e GENE, 2009).

Aleloquímicos são propensos à degradação e dificilmente se acumulam em um ecossistema e seus efeitos inibitórios sobre o crescimento de algas são significativamente espécie-específico, exibindo uma inibição significativa de apenas certas algas (MEN et al., 2007). Rice (1984) acredita que aleloquímicos poderiam, eventualmente, ser utilizados para substituir os reagentes químicos para eliminar algas, reduzindo assim grandemente a utilização de produtos químicos.

Os aleloquímicos produzidos por plantas aquáticas são reagentes naturais na eliminação de algas, e, portanto, a adição de aleloquímicos extraídos de plantas aquáticas para controlar o crescimento de algas é uma técnica promissora (NAKAI et al., 1996; BALL et al., 2001; NI et al., 2012). Além disso, o desperdício dos resíduos pós-extração pode ser tratado com uma combinação de métodos de reciclagem, tal como a fabricação de papel e na produção de biogás através de fermentação (MULDERIJ et al., 2005a, b; ERHARD e GROSS, 2006).

4 *PISTIA STRATIOTES*

A espécie *Pistia stratiotes* L., conhecida popularmente como alface d'água, flor-d'água, erva-de-santa-luzia, lentilha-d'água, mururé, golfo, muréré-pagé, pagé ou pasta, é uma planta aquática flutuante, amplamente distribuída por todo o mundo, cuja origem ainda não foi totalmente definida, sendo atribuída à África ou América do Sul (LORENZI, 1982; CARDOSO et al., 2005). É também considerada espécie ornamental, por auxiliar na estética de ambientes aquáticos artificiais (LORENZI, 1982).

P. stratiotes é uma espécie pertencente à família Araceae, de porte herbáceo, caule, estolonífera, com propagação sexuada e assexuada por meio de seus estolões, cuja via preferencial de reprodução é a vegetativa (LORENZI, 1982; CARDOSO et al., 2005). Possui folhas sésseis, esponjosas, espatuladas, obtusas e densamente pubescentes, dispostas em rosetas, em que as radicais têm o pecíolo maior e mais largo do que as outras, de coloração verde aveludada na face adaxial e verde pálida esbranquiçada na face abaxial. A inflorescência é pequena e de cor branca e creme, composta por espádice cercada por uma espata pilosa, característica das aráceas, encontradas no centro da roseta (LORENZI, 1982; COELHO et al., 2005).

Por sua alta capacidade de reprodução vegetativa e rápido crescimento, *P. stratiotes* geralmente é responsável pela formação de densos tapetes de plantas sobre a superfície aquática, sendo considerada como uma espécie daninha, afetando o aproveitamento econômico dos sistemas aquáticos, como por exemplo, a proliferação desta espécie em viveiros de criação de peixes na África, em canais de irrigação em Gâmbia e em um braço do reservatório da usina de Itaipu no Brasil (TERRY, 1981; LORENZI, 1982; THOMAZ et al., 1999; PETR, 2000; COELHO et al., 2005). Além disso, esta macrófita aquática também tem sido utilizada para a remoção de mercúrio de efluentes de mineração, por esta acumular o metal em suas raízes, indicada para remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e sólidos suspensos na água, melhorando a qualidade dos sistemas aquáticos, e para o tratamento de

esgoto urbano, por sua elevada taxa de crescimento, demonstrando seu potencial de utilização na fitorremediação, como medida mitigadora da contaminação de efluentes (ZIMMELS et al., 2006; SKINNER et al., 2007; ESPINOZA-QUINONES et al., 2009; TEWARI et al., 2008; LU et al., 2010; PUTRA et al., 2015; LIN e LI, 2016).

Além de sua utilização na fitorremediação e bioindicação, estudos científicos vêm demonstrando para este gênero ações farmacológicas como, antioxidante e cicatrizante (JHA et al., 2012), pesquisas também demonstraram que *P. stratiotes* pode interferir e controlar o crescimento de microrganismos e algas em sistemas de água doce, sendo que alguns trabalhos mostram que o controle ocorre nas principais divisões de algas e incluem também a ação sobre cianobactérias, porém não existem dados sobre o mecanismo de ação dos componentes ativos desta espécie sobre estes microrganismos (ALIOTTA et al., 1991; BICH e NOGUCHI, 2012; WU et al., 2013). Estas características tornam esta espécie alvo de estudos para novas e importantes pesquisas no controle de cianobactérias produtoras de cianotoxinas.

REFERÊNCIAS

- ALIOTTA, G.; MONACO, P.; PINTO, G.; POLLIO, A. Previtera, L. Potential Allelochemicals From *Pistia Stratiotes* L. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 17, n. 11, p. 2223–2234, nov. 1991.
- BALL, A. S.; WILLIAMS, M.; VINCENT, D.; ROBINSON, J. Algal growth control by a barley straw extract. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 177–181, abr. 2001.
- BAUER, N.; BLASCHKE, U.; BEUTLER, E.; GROSS, E. M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; HILT, S. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 2, p. 110–116, ago. 2009.
- BICH, T. T. N.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. **Aquatic Botany**, v. 103, p. 30–36, out. 2012.
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 477 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518/2004, de 25 de Março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**. Diário Oficial da União, nº 59, 26 de março de 2004. Seção I. p. 266-270.

BRIAND, J. F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.-F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**, v. 34, p. 361–377, jul.-ago. 2003.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MORI, E. S.; TERRA, M. A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia Stratiotes*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 181-185, abr.-jun. 2005.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445-459, jun. 1992.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p. 78-86, jan. 1994.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN, J.; 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. 663–668, jul. 2001.

CHORUS, Ingrid (Ed.). **Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001. 357 p.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring, and Management**. London: E & FN Spon, 1999. 440 p.

COELHO, F. F.; DEBONI, L.; LOPES, F. S. Density-dependent reproductive and vegetative allocation in the aquatic plant *Pistia Stratiotes* (Araceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 53, n. 3-4, p. 369-376, set. 2005.

DE LA CRUZ, A. A.; ANTONIOU, M. G.; PELAEZ, M.; HISKIA, A.; SONG, W.; O'SHEA, K. E.; HE, X.; DIONYSIOU, D. D. Can we effectively degrade microcystins? – implications for impact on human health status. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 19-37, jan. 2011.

DRABKOVA, M.; MATTHIJS, H. C. P.; ADMIRAAL, W.; MARSLEK, B. Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 45, n. 3, p. 363-369, set. 2007.

ERHARD, D.; GROSS E. M. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. **Aquatic Botany**, v. 85, n. 3, p. 203–211, out. 2006.

ESPINOZA-QUINONES, F. R.; MARTIN, N.; STUTZ, G.; TIRAO, G.; PALÁCIO, S. M.; RIZZUTTO, M. A.; MÓDENES, A. N.; SILVA Jr., F. G.; SZYMANSKI, N.; KROUMOV, A. D. Root uptake and reduction of hexavalent chromium by aquatic macrophytes as assessed by high-resolution X-ray emission. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4159-4166, set. 2009.

FALCONER, I. R. Algal toxins and human health. HRUBEC J. (Ed.). **The Handbook of Environmental Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v. 5 (Part C), p. 53–82, 1998.

FALCONER, I. R. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Springer-Verlag, New York, v. 619, p. 607–612, 2008.

FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B.; SOUZA, B. D. A. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 247-58, jun. 2009.

FERRIER, M. D.; BUTLER, B. R.; TERLIZZI, D. E.; LACOUTURE, R. V. The effects of barley straw (*Hordeum vulgare*) on the growth of freshwater algae. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1788–1795, nov. 2005.

GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 367–374, maio-jun. 2010.

GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 313–339, maio 2003.

GROSS, E. M.; GENE, E. L. Allelochemical reactions. LIKENS GE (ed.) **Encyclopedia of inland waters**, Oxford: Academic Press, p. 715–726, 2009.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P. N.; KAKKAR, P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 1–21, jul. 2003.

JHA, M.; SHARMA, V.; GANESH, N. Antioxidant and wound healing potential of *Pistia stratiotes* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 579-584, dez. 2012.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, M. D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO FILHO, 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. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873–878, mar. 1998.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1–9, mar. 2001.

KOTOPOULIS, S.; SCHOMMARTZ, A.; POSTEMA, M. Sonic cracking of blue-green algae. **Applied Acoustics**, v. 70, n. 10, p. 1306–1312, out. 2009.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I. R.; FITZGERALD, J. Human health aspects. CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London: E & FN Spon, p. 113–153, 1999.

LAM, A. K. Y.; PREPAS, E. E; SPINK, D.; HRUDEY, S. E. Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. **Water Research**, v. 29, n. 8, p. 1845–1854, ago. 1995.

LIANG, H.; NAN J. Algae removal by ultrasonic irradiation–coagulation. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 191–197, abr. 2009.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 7, p. 727-736, mar. 2004.

LIN, Y.-L.; LI, B.-K. Removal of pharmaceuticals and personal care products by *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 58, p. 318-323, jan. 2016.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo: Nova Odessa, 1982. 425p.

LU, Q.; HE, Z. L.; GRAETZ, D. A.; STOFFELLA, P. J.; YANG, X. Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Environmental Science Pollution Research**, v. 17, n. 1, p. 84-96, jan. 2010.

MEN, Y. J.; HU, H. Y.; LI, F. M. Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate from the reed (*Phragmites australis* Trin) on the growth of several common species of green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 521-527, ago. 2007.

MORENO, I.; REPETTO, G.; CARBAL, E.; GAGO, A.; CARMEÁN, A. M. Cyanobacteria and microcystins occurrence in the Guadiana River (SW Spain). **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 461-474, jun. 2005.

MULDERIJ, G.; MOOIJ, W. M.; SMOLDERS, A. J. P. Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides*. **Aquatic Botany**, v. 82, n. 4, p. 284-296, ago. 2005a.

MULDERIJ, G.; MOOIJ, W. M.; VAN DONK, E. Allelopathic growth inhibition and colony formation of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the aquatic macrophyte *Stratiotes aloides*. **Aquatic Ecology**, v. 39, n. 1, p. 11-21, mar. 2005b.

NAKAI, S.; HOSOMI, M.; OKADA, M.; MURAKAMI, A. Control of algal growth by macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7-8, p. 227-235, jan. 1996.

NAKAI, S.; INOUE, Y.; HOSOMI, M.; MURAKAMI, A. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 34, n. 11, p. 3026-3032, ago. 2000.

NI, L. X.; ACHARYA, K.; HAO, X. Y.; LI, S. Y. Isolation and identification of an anti-algal compound from *Artemisia annua* and mechanisms of inhibitory effect on algae. **Chemosphere**, v. 88, n. 9, p. 1051-1057, ago. 2012.

OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A.-M.; GROBBELAAR, J. U. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 159-168, mar. 2004.

OU, N.; GAO, Y.; DENG, Y.; QIAO, J. L.; WANG, H. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1241–1250, mar. 2012.

PATTERSON, G. M. L.; LAISEN, L. K.; MOORE, R. E. Bioactive natural products from blue-green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 151-157, abr. 1994.

PEARSON, L. A.; HISBERGUES, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E.; NEILAN, B. A. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6370–6378, nov. 2004.

PETR, T. Interactions between fish and aquatic macrophytes in inland waters. A review. **FAO Fishers Technical Paper**, Rome: FAO, n. 396, 2000. 185 p.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.; BARRETO, V.; WARD, C.; PREISER, W.; POON, G.; NEILD, G.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, p. 21–26, jul. 1998.

PUTRA, R. S.; CAHYANA, F.; NOVARITA, D. Removal of Lead and Copper from Contaminated Water Using EAPR System and Uptake by Water Lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 381–386, 2015.

RAI, A. N. (ed.). **Handbook of Symbiotic Cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 253 pp.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. (eds.) **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment**. New York: John Wiley, 2000.

RICE, E. L. **Allelopathy**, 2 ed. London: Academic Press, p. 119–139, 1984.

SANCHES, S. M.; PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 2012.

SKINNER, K.; WRIGHT, N.; PORTER-GOFF, E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. **Environmental Pollution**, v. 145, n. 1, p. 234-237, jan. 2007.

STEWART, I.; WEBB, P. M.; SCHLUTER, P. J.; SHAW, G. R. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. **Environmental Health**, v. 5, n. 6, mar. 2006.

SVIRČEV, Z.; KRSTIĆ, S.; MILADINOV-MIKOV, M.; BALTIĆ, V.; VIDOVIĆ, M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. **Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 36–55, fev. 2009.

SVIRČEV, Z.; SIMEUNOVIĆ, J.; SUBAKOV-SIMIĆ, G.; KRSTIĆ, S.; VIDOVIĆ, M. Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. **Geographica Pannonica**, v. 11, p. 32–38, 2007.

TERRY, N.; BANUELOS, G. S. Phytoremediation of contaminated soil and water. **Boca Rotan: Lewis Publisher**, 2000. 408 p.

TERRY, P. J. Weeds and their control in the Gambia. **Tropical Pest Management**, v. 27, n. 1, p. 44–52, mar. 1981.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; UN, R. A. I. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8715–8721, dez. 2008.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M.; SOUZA, M. C.; KITA, K. K.; CAMARGO, A. F. M. Aquatic macrophytes of Itaipu Reservoir, Brazil: survey of species and ecological considerations. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 1, p. 15–22, 1999.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, n. 9, p. 1631–1646, fev. 2002.

World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality**, vol. 1, 3 ed., Geneva, 2004.

WU, X.; WU, H.; CHEN, J.; YE, J. Effects of allelochemical extracted from water lettuce (*Pistia stratiotes* Linn.) on the growth, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8192–8201, maio 2013.

YU, Z. W.; SUN, W. H.; GUO, K. Q.; YU, S. W. Allelopathic effects of several aquatic plants on algae. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 1992.

ZHOU, L.; YU, H.; CHEN, K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 15, n. 2, p. 166–171, jun. 2002.

ZHU, Z.; LIU, Y.; ZHANG, P.; ZENG, G.; HU, X.; LI, H.; GUO, Y.; GUO, X. Co-culture with *Cyperus alternifolius* induces physiological and biochemical inhibitory effects in *Microcystis aeruginosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 118–124, out. 2014.

ZIMMELS, Y.; KIRZHNER, F.; MALKOVSKAJA, A. Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. **Journal of Environmental Management**, v. 81, n. 4, p. 420–428, dez. 2006.

Capítulo Único

Respostas fisiológicas de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (Kützinger) produtora de microcistina, exposta aos extratos de *Pistia stratiotes* L.

Anderson Lourenção^a, Gustavo F. Mecina^b, Maria C. Bittencourt-Oliveira^c, Regildo M. G. Silva^{a1}

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

^bUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, UNESP campus Araraquara, Rua Prof. Francisco Degni, 55 Bairro: Quitandinha CEP: 14800-060, Araraquara, SP

^cUniversidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP/ESALQ) Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Pádua Dias, 11, Bairro Universitário, CEP: 13418-900, Piracicaba, SP

¹Corresponding Author: Tel.: +55 18 33025848; fax: +55 18 33025802.

E-mail address: regildos@yahoo.com.br

RESUMO

No presente estudo, extratos aquoso e etanólico de *Pistia stratiotes* L foram preparados para avaliar o efeito inibitório e as respostas fisiológicas em *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (cepa BCCUSP232). Para tanto uma seleção de compostos e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo na cianobactéria foram analisadas. A exposição da *M. aeruginosa* às diferentes concentrações dos extratos (100, 250 e 500 mg/L) resultou em uma redução significativa na densidade celular da cepa. Essa redução foi expressiva na maior concentração de extrato aquoso utilizada (500 mg/L), onde no 6º dia de tratamento a densidade celular foi reduzida a 0. Para o extrato etanólico, perfil semelhante foi observado, sendo que para a maior concentração utilizada (500 mg/L), a densidade celular foi reduzida a 0 no 4º dia de exposição. Além disso, *P. stratiotes* reduziu a concentração de proteínas totais, aumentou a produção interna de peróxido de hidrogênio e malondialdeído nas cianobactérias, e no geral, a produção da peroxidase, catalase e glutathione-S-transferase relacionadas com o metabolismo de defesa antioxidante da cianobactéria. Houve um declínio acentuado nos níveis da superóxido dismutase (SOD), causando assim a acumulação de radicais e peróxidos livres, sugerindo que este seja o fator mais importante relacionado à ação algistática dos extratos de *P. stratiotes*. Não foi possível verificar atividade pró-oxidativa de ambos os extratos no teste de degradação da albumina sérica bovina. Para os resultados da determinação de fenóis e flavonoides totais, verificou-se para o extrato etanólico concentração de 93.36 µg para o teste de polifenóis totais e 217.33 µg para o teste de flavonoides. Já para o extrato aquoso foi verificado 5.19 µg para o teste de fenóis totais e 11.02 µg para o teste de flavonoides. Diante destes resultados foi possível concluir que *P. stratiotes* apresenta potencial para controle de populações de cianobactérias, sugerindo que esta ação pode estar correlacionada com o estresse oxidativo causado às mesmas.

Palavras chave: Cianobactéria. Alelopatia. Fenóis. Flavonoides.

1 INTRODUÇÃO

O aumento das atividades urbanas, industriais e agrícolas, assim como a descarga de seus efluentes nos corpos d'água ocasionam e aceleram o processo de eutrofização (HEISLER et al., 2008). A eutrofização aliada à elevação da temperatura tem como uma das consequências a rápida proliferação de cianobactérias no ambiente aquático, processo conhecido como “floração” ou “bloom” (NARDINI e NOGUEIRA, 2008; O'NEIL et al., 2012). Algumas espécies de cianobactérias produzem metabólitos secundários tóxicos denominados de cianotoxinas, as quais provocam um importante impacto no meio ambiente e na saúde humana (PAERL et al., 2001; KOZDEBA et al., 2014). No Brasil, entre os gêneros potencialmente nocivos, destacam-se *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Aphanocapsa* (CALIJURI et al., 2006). *Microcystis aeruginosa*, em particular, uma alga preponderante em florações de cianobactérias, é considerada uma séria ameaça à saúde humana e à segurança biológica devido à microcistina, um metabolito tóxico secretado pela mesma (PIVOKONSKY et al., 2014 e ZAKARIA et al., 2014).

No que diz respeito aos metabólitos secundários tóxicos das cianobactérias, estes podem causar graves injúrias tanto por meio da ingestão como no contato tópico com a água contaminada (HOEGER et al., 2004). As principais toxinas produzidas pelos gêneros de cianobactérias são Microcistinas, Nodularinas, Anatoxinas, Cilindrospermopsinas e Saxitoxinas, sendo estas classificadas de acordo com seu mecanismo de ação como hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas, dermatotóxicas ou promotoras da inibição da síntese de proteínas (CARNEIRO e LEITE, 2008).

Neste sentido, algumas medidas são utilizadas para reduzir e/ou eliminar os efeitos do crescimento de cianobactérias e suas consequências ao meio ambiente, as medidas compreendem ações físicas e químicas (DRABKOVA et al., 2007). As físicas são representadas por filtração, separação centrífuga e ultrassom, já os tratamentos químicos utilizam sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio (DRABKOVA et al., 2007; OU et al., 2012). Outra alternativa viável é o controle biológico, que utiliza a introdução de organismos previamente selecionados como peixes e organismos zooplancônicos (SPIROS et al., 2009; LIANG e NAN, 2009). Entretanto, essas medidas apresentam sucesso limitado, pois são muito dispendiosas, sendo utilizadas apenas como soluções emergenciais. Desta forma, há a necessidade de novas pesquisas para a elaboração de novas técnicas, menos onerosas e mais eficazes, que produzam menor impacto ambiental e maior durabilidade, refletindo também na sustentabilidade (FERRIER et al., 2005).

Diante do exposto, estudos recentes têm demonstrado a aplicabilidade de compostos de origem vegetal como importantes recursos para o controle de micro-organismos, algas e plantas daninhas, que prejudicam de forma direta e/ou indireta a saúde das populações, tanto aquáticas, quanto terrestres, assim como a produção agrícola (BORELLA e PASTORINI, 2009; RIBEIRO et al., 2009; BARROS et al., 2011, SILVEIRA, 2012). Desde a década de 80, pesquisas vem demonstrando a possibilidade da realização do controle de cianobactérias e outros organismos por produtos de origem vegetal (WIUM-ANDERSEN et al., 1983).

Uma espécie com potencial para produzir compostos secundários promissores para o controle de cianobactérias é a *Pistia stratiotes* L. (Araceae) (WU et al., 2013). Popularmente conhecida como alface d'água, é caracterizada como uma macrófita aquática flutuante livre, com distribuição cosmopolita tropical (POTT e POTT, 2000). É considerada uma espécie que prolifera indesejadamente em alguns ecossistemas aquáticos tropicais. Pode-se destacar como exemplos de crescimento indesejado de *P. stratiotes* a proliferação em viveiros de criação de peixes na África, em canais de irrigação em Gâmbia e no reservatório de Itaipu no Brasil (TERRY, 1981; THOMAZ et al., 1999; PETR, 2000).

Estudos científicos sobre o gênero *Pistia* vêm demonstrando interessantes ações farmacológicas, como antioxidante e cicatrizante (JHA et al., 2012). Além dessas ações, apresentou resultados promissores no tratamento de lodo, esgoto, água contaminada e na detoxificação de diversos tipos de metais (ZIMMELS et al., 2006; TEWARI et al., 2008; PUTRA et al., 2015). Extratos e compostos obtidos de *P. stratiotes* L. também demonstraram a capacidade de controlar o crescimento populacional de micro-organismos e algas em sistemas de água doce, sendo que alguns trabalhos mostram que isto ocorre nas principais divisões de algas e incluem também a ação sobre cianobactérias (ALIOTTA et al., 1991; BICH e NOGUCHI, 2012; WU et al., 2013). Estas características apresentadas por *P. stratiotes* tornam esta espécie alvo de estudos para novas e importantes pesquisas para o controle de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a) o potencial algicida e/ou algistático dos extratos de *P. stratiotes* no controle da população de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (Kützinger) linhagem BCCUSP232 (cianobactéria) em condições laboratoriais; b) avaliou as respostas fisiológicas da cianobactéria exposta a diferentes concentrações e tempo de incubação com os diferentes extratos; c) o teor de polifenóis totais presentes nos diferentes extratos de *P. stratiotes*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e preparo dos extratos

Pistia stratiotes foi coletada na cidade de Assis, localizado no sudeste brasileiro, em uma lagoa pública e sem causar impacto na população de plantas, entre maio e julho de 2015 (22°44'59,40 "S e 50°31'40,40"W). O espécime comprovante foi depositado no Herbário Assisense sob o número de tombamento HASSI-1038. As plantas inteiras foram limpas e secas a 40°C em estufa com circulação de ar (Cienlab, Brasil) e posteriormente moídas em um moinho de facas (Cienlab, CE-430, Brasil). O pó resultante foi utilizado nas extrações com etanol por percolação (temperatura ambiente e extração exaustiva), de acordo com PRISTA et al. (1995). O extrato resultante foi filtrado sob vácuo e levado a um evaporador rotativo para retirada do solvente (Marconi, MA-120, Brasil). Para a extração aquosa, o mesmo processo foi utilizado, substituindo o etanol por água destilada. Após a extração, o extrato foi congelado e subsequentemente liofilizado (Liotop, L101, Brasil). Os extratos secos foram mantidos em pequenos frascos âmbar à temperatura ambiente até sua utilização.

2.2 Avaliação do potencial algicida e/ou algistático

Para a montagem do bioensaio foi utilizada a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, cepa BCCUSP232, produtora de microcistinas de acordo com BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. (2011). A cepa foi obtida a partir da Coleção Brasileira de Cianobactéria da Universidade de São Paulo (BCCUSP) e mantidas em meio de cultivo ASM-1 (GORHAM et al. 1964), pH 7,4, em condições ambientais controladas (intensidade de luz: 40 mmol m/s, mensurada com um Quantômetro LI-COR, modelo LI-250, equipado com um sensor esférico sub-aquático; fotoperíodo: 14:10 h, claro:escuro, e temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$).

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se Erlenmeyers de 1000 ml com 700 ml de meio ASM-1, em câmaras de cultura nas condições acima descritas. Todos os experimentos iniciaram com a densidade de $2,3 \times 10^5$ células/mL de *M. aeruginosa* obtida a partir da mesma cultura em fase de crescimento exponencial. Na fase de crescimento exponencial (dia 4) das culturas experimentais, foram coletadas amostras para a determinação da densidade celular antes da adição dos extratos, a fim de confirmar o estágio de crescimento da cepa. Logo após, a cianobactéria foi exposta separadamente a extratos de *P. stratiotes* (etanólico e aquoso) nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/L e incubada durante 6 dias. As culturas do grupo controle não foram expostas aos extratos, porém foram mantidas nas mesmas condições às dos grupos experimentais. As amostras foram coletadas no 2°, 4° e 6°

dia de exposição aos extratos utilizando de capela de fluxo laminar e técnicas estéreis para determinação da densidade celular, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), proteínas totais e atividade enzimática do metabolismo antioxidante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O crescimento da população da cianobactéria foi determinado utilizando a densidade celular obtida a partir de curvas de calibração de culturas de *M. aeruginosa* com densidades celulares conhecidas em espectrofotômetro a 750 nm (Biospectro SP-22, Biospectro, Curitiba, Brasil). A equação de regressão obtidas a partir da curva de calibração é dada a seguir: $y = (3 \times 10^{-8})x + 0,0058$, onde y é a absorbância, x representa a densidade celular, e $R^2 = 0,9992$.

2.3 Avaliação do mecanismo de ação dos extratos de *P. stratiotes* em *M. aeruginosa* BCCUSP 232

2.3.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada estimando-se o teor de malondialdeído (MDA). Primeiramente, a biomassa obtida a partir do *pellet* formado pela centrifugação de 40 mL das coletas de cultura de *M. aeruginosa*, foram homogenizadas em tampão de fosfato 0,1 mol (pH 6,5) contendo 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), e posteriormente centrifugadas a $10.000 \times g$ e $0^\circ C$ durante 10 min. Seguindo o método de MADHAVA RAO e SRESTY (2000) com modificações, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante das amostras foram transferidas para tubos de vidro e adicionados 4 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) a 20 % (p/v). A mistura foi aquecida a $95^\circ C$ durante 30 min e posteriormente resfriada em banho com gelo. A mistura resultante foi centrifugada a $10.000 \times g$ durante 15 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm. As medições foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mmol/cm, conforme DEMIRAL e TÜRKAN (2005). Os resultados foram apresentados em mmol/L.

2.3.2 Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio interno (H_2O_2)

O método de JANA e CHOUDHURI (1982) foi utilizado para medir a formação interna de H_2O_2 por *M. aeruginosa*, com algumas modificações. O *pellet* resultante da centrifugação de 40 ml da cultura de *M. aeruginosa* a $2.200 \times g$ e $0^\circ C$, foi homogeneizado em 3 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) para extração do H_2O_2 interno. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ e $0^\circ C$ durante 10 min, e o sobrenadante utilizado para a determinação de H_2O_2 . Para medir a concentração de H_2O_2 , 133 ml de cloreto de titânio 0,1%

(em 20% H_2SO_4) foram adicionados a 400 ml do sobrenadante, e após 1 min de incubação, a absorbância da mistura de cor vermelho-laranja foi medida a 410 nm com um espectrofotômetro Biospectro SP-22. O coeficiente de extinção de 0,28 L mmol/cm foi utilizado para calcular a concentração de H_2O_2 em $\mu\text{mol/g}$.

2.3.3 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada com biomassa de 40 mL de cultura de *Microcystis aeruginosa*, homogeneizada em tampão de fosfato 0,1 mol (pH 6,5) contendo 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) e centrifugada a 10.000 x g e 0°C durante 10 min. O sobrenadante foi usado para a medição de proteínas totais e os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes. A concentração total de proteínas foi determinada de acordo com BRADFORD (1976) e expressa em $\mu\text{g/ml}$, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.3.4 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi determinada com base na sua função peroxidativa de acordo com JOHANSSON e BORG (1988). Este método utiliza metanol como um doador de hidrogênio para a catalase, o que resulta na formação de formaldeído que é medido colorimetricamente com Purpald. Duzentos e cinquenta μL de tampão fosfato de potássio (25 mmol, pH 7,0) foram incubados com 250 ml de metanol e 50 ml de peróxido de hidrogênio (0,27%, v/v). A reação foi iniciada pela adição de 500 ml de extrato da enzima à temperatura ambiente (20°C), com agitação contínua. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 250 ml de hidróxido de potássio 7,8 M. Em seguida, 500 ml de Purpald 34,2 mmol (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol) em HCl a 480 mmol foi adicionado, e a mistura reacional foi incubada novamente durante 10 min a temperatura ambiente com agitação contínua. A adição de 250 ml de periodato de potássio 65,2 mmol produziu uma cor púrpura, cuja absorbância foi lida a 550 nm com um espectrofotômetro Biospectro SP-22. A atividade da enzima foi calculada a partir de curvas de calibração feitas com formaldeído (0-120 mmol). Uma unidade (U) de CAT foi definida como a quantidade de enzima que causou a formação de 200 mmol de formaldeído nas condições do ensaio acima definidas. A atividade de CAT foi expressa em unidade (U)/ml de amostra. Atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com REDDY et al. (1996). Três ml de solução de pirogalol (0,05 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5) e 0,5 ml de H_2O_2 1% foram misturados em uma cubeta, e a reação foi

iniciada pela adição de 0,1 ml de extrato da enzima. A alteração na absorbância por minuto é proporcional à atividade da enzima. A atividade foi apresentada em U/ml de extração.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada espectrofotometricamente de acordo com os procedimentos descritos por MISRA e FRIDOVICH (1972). O meio de incubação continha num volume final de 3,0 ml, tampão de fosfato de potássio 6,7 mmol (pH 7,8), metionina 45 mmol, 0,53 mmol de riboflavina, 84 mmol de cloreto de nitro azul de tetrazólio (NBT). Os tubos de reação contendo o meio de incubação foram colocados numa câmara forrada com folhas de alumínio e iluminados com duas lâmpadas fluorescentes de 15 W, a 25 °C durante 10 min. Após a exposição à luz, a absorbância do meio de incubação foi medida por espectrofotometria a 600 nm. A quantidade de homogeneizado adicionado ao meio de incubação foi mantida abaixo de uma unidade de enzima para assegurar precisão suficiente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que inibiu 50% da redução de NBT, de acordo com a equação abaixo: $\%I = (AS - ANC) / ANC$, onde %I é a percentagem de inibição; AS é a absorbância das amostras, e ANC a absorbância do controle negativo (sem extrato da enzima).

O doseamento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi realizada utilizando o modelo de substrato padrão dinitrobenzeno 1-cloro-2,4- (CDNB) de acordo com MAUCH e DUDLER (1993). A reação foi iniciada pela adição de 100 µl de extrato da enzima a 2 ml da mistura reacional contendo 3,6 mmol de glutathione reduzida e 1 mmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5). A atividade enzimática foi determinada através do monitoramento da variação da absorbância a 340 nm. A alteração na absorbância foi diretamente proporcional à atividade de GST.

2.3.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos para a densidade celular, peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio, proteínas totais e enzimas antioxidantes, tiveram suas médias e os desvios padrões calculados, além disso, receberam tratamento estatístico por meio de testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade (Levene). Para identificar as diferenças entre os tratamentos, incluindo o controle, os dados foram analisados por meio de testes paramétricos (ANOVA e Tukey; $\alpha=0,05$).

2.4 Quantificação de fenóis e flavonoides totais dos extratos

A quantificação de fenóis e flavonoides dos extratos foi realizada pela diluição dos extratos em etanol nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1.000, 3.000, 5.000 e 10.000 µg/ml. Para a determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de SINGLETON e ROSSI (1965). Para cada 0,5 ml de extrato nas diferentes concentrações foi adicionada 5 ml de água destilada, além de 0,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 1 ml de solução saturada de Na_2CO_3 foi adicionada a 10% e a mistura foi armazenada durante 1 h. A absorbância foi medida a 725 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Modelo: SP220, BIOSPECTRO, Brasil). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em µg equivalente de ácido gálico (AGE) por miligrama de extrato.

A quantificação dos flavonoides totais dos extratos foi determinada com base no espectrofotômetro UV-Vis e as amostras foram preparadas como descrito por ZHISHEN, MENGCHENG e JIANMING (1999), com base na complexação dos flavonóides com AlCl_3 . Uma alíquota de 250 µl de extrato em diferentes concentrações foi misturada com 1,25 ml de água destilada e 75 µl solução de NaNO_2 em 5%. Após 6 min, foi adicionada uma solução de 150 µl AlCl_3 / H_2O a 10%. Após 5 min, foi adicionado 0,5 ml de uma solução de NaOH 1 M e, em seguida, o volume total foi ajustado por adição de 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em misturador de vórtice e a absorbância foi medida a 510 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em µg equivalente de rutina (RE) por miligrama de extrato.

2.5 Degradação oxidativa da albumina sérica bovina

O ensaio foi adaptado a partir do método proposto por HSIEH et al. (2005). Albumina do soro bovino (2 mg/ml) foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) (10 mmol, pH 7,4) e incubada com Cu^{2+} (2 mmol) a 37°C durante 2 dias na presença de 10 (0,5mg/ml), 100 (1mg/ml), 500 (5mg/ml), 1000 (10mg/ml) µl dos extratos e solução contendo 5 mmol de peróxido de hidrogénio (controle positivo). O controle consistia apenas de solução de BSA (110 µg/ml) em tampão fosfato. A eletroforese foi realizada utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (12% gel de corrida e 5% gel de empacotamento) de acordo com técnicas estabelecidas (Encor Inc® Biotechnology, EUA). A atividade oxidativa foi avaliada por comparação dos tratamentos com o controle (PBS + BSA).

3 RESULTADOS

3.1 Bioensaios com *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

Conforme apresentado na Figura 1 e Tabela 1, os extratos de *P. stratiotes* exibiram um efeito inibitório sobre a cepa de *M. aeruginosa*. Em contraste com o grupo controle, a densidade celular de *M. aeruginosa* nas três concentrações testadas (100, 250 e 500 mg/L) para ambos os extratos foi significativamente reduzida durante o período de teste de 6 dias ($P < 0,05$). Esta redução foi observada para as diferentes concentrações do extrato aquoso a partir da primeira leitura, no 2º dia após a aplicação do extrato, sendo estes estatisticamente diferentes em comparação com o controle. A inibição máxima do crescimento celular foi alcançada na concentração de 500 mg/L do extrato aquoso no 6º dia. Para o extrato etanólico, observou-se um perfil semelhante e, para a maior concentração utilizada, a densidade celular foi reduzida para 0 no 4º dias após a adição do extrato. Os resultados demonstraram que o extrato de *P. stratiotes* apresenta um forte efeito inibitório sobre as cianobactérias estudadas e todas as doses testadas neste estudo foram eficazes para este efeito.

Tabela 1. Densidade celular média de *M. aeruginosa* BCCUSP232 submetida às diferentes concentrações dos extratos de *P. stratiotes*.

	Concentração mg/mL	Nº células 10 ³ /mL antes da adição dos extratos	Nº células 10 ³ /mL 2º dia	Nº células 10 ³ /mL 4º dia	Nº células 10 ³ /mL 6º dia
Extrato aquoso	100	618±77 a	629±96 b	1.029±69 b	1.973±291 b
	250	562±69 a	573±88 b	962±184 b	1.518±283 b
	500	573±88 a	496±139 b	396±204 c	0±0 c
Extrato etanólico	100	618±19 a	996±107 a	1.429±84 a	1.984±107 b
	250	651±38 a	1.084±184 a	418±19 b	873±219 b
	500	607±120 a	107±219 b	0±0 c	218±69 c
Controle		573±0 a	951±19 a	1.507±120 a	2.462±69 a

Analizados por meio do teste ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). Diferentes letras denotam significância estatística ($p < 0,05$).

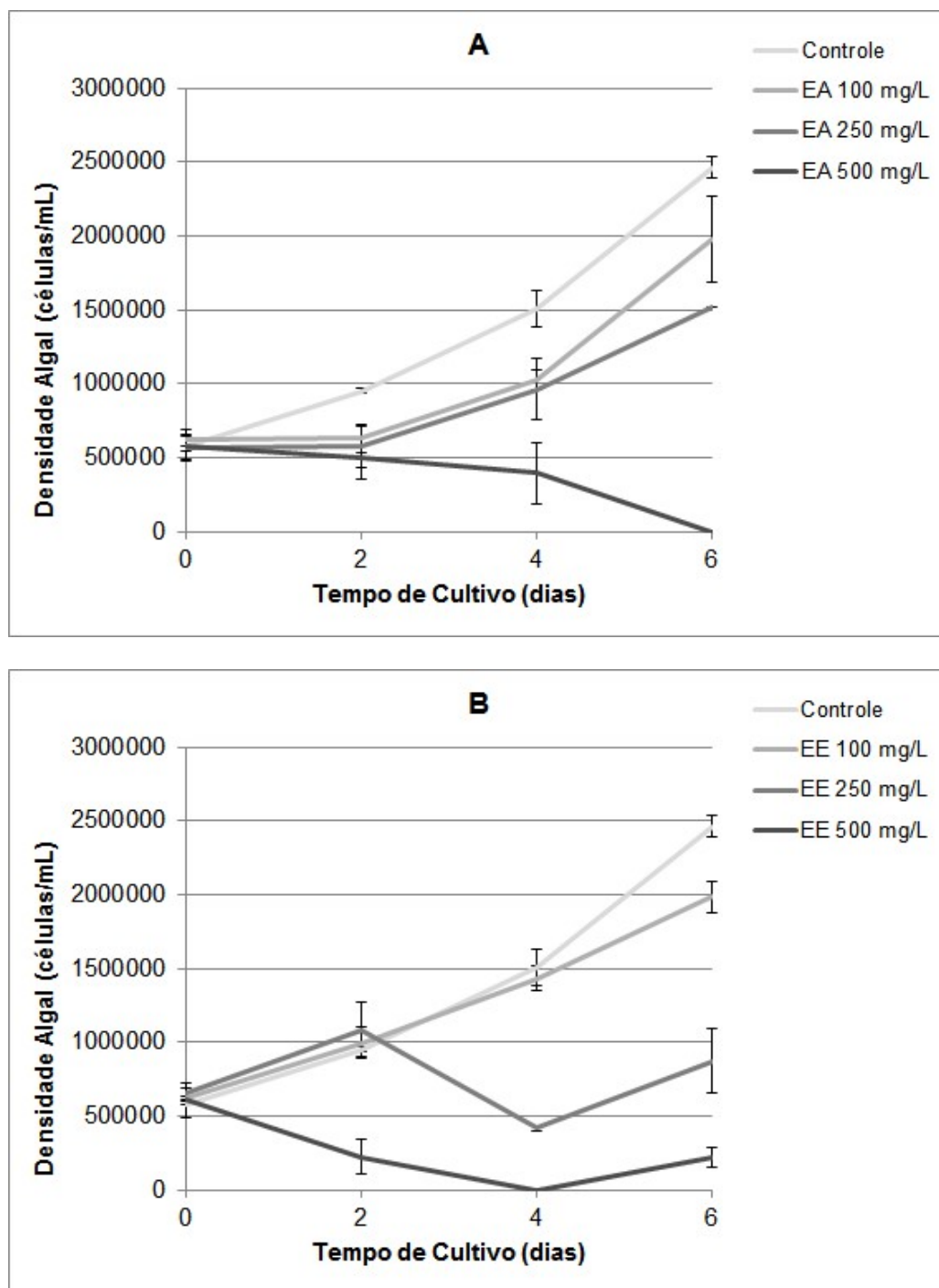


Figura 1. Efeito inibitório do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* no crescimento de *M. aeruginosa* BCCUSP232. As barras correspondem ao desvio padrão (n=3).

3.2 Determinação da Peroxidação Lipídica

O desequilíbrio gerado no estado redox celular foi acompanhado pelo aumento do teor de malondialdeído (MDA), que foi utilizado como indicador de peroxidação lipídica nos tratamentos com diferentes concentrações de extratos de *P. stratiotes* (Figura 2 A e B). O conteúdo de MDA nas células algais expostas a todas as concentrações dos extratos de *P.*

stratiotes aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle. Este aumento pode ser visto a partir do 2º dia de exposição para ambos os extratos. O valor máximo de MDA foi de 0,16 (6º dia) e 0,18 (4º dia) mmol/L, para o extrato aquoso e etanólico respectivamente. Contudo, tal como acima referido, no mesmo período a densidade celular da cepa de cianobactéria foi significativamente reduzida para os diferentes tratamentos em comparação com o controle (Figura 1).

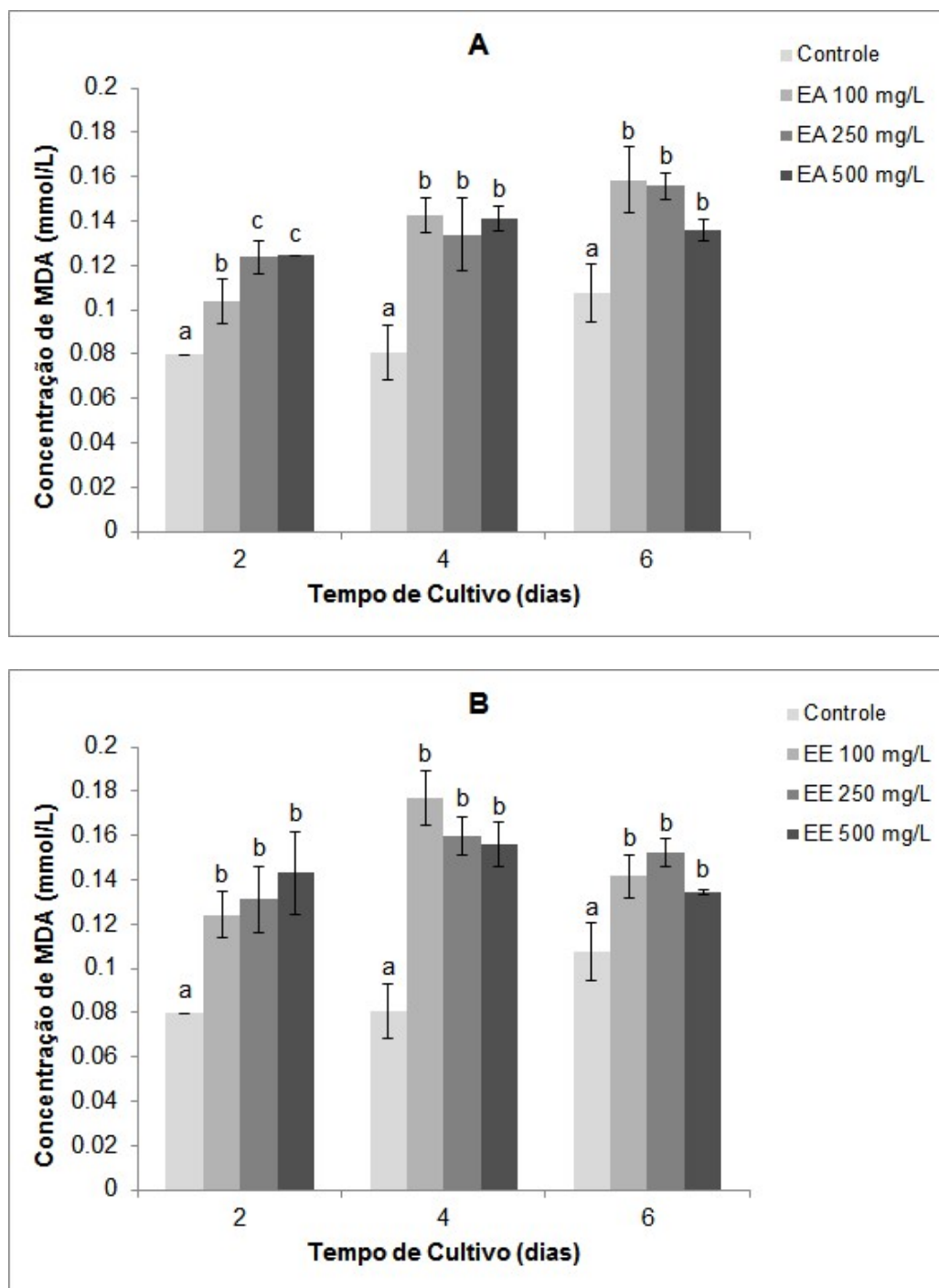


Figura 2. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* no conteúdo de Malondialdeído em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos ‘a’, ‘b’, e ‘c’ representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

3.3 Determinação de Peróxido Hidrogênio (H_2O_2)

Os resultados obtidos na determinação de peróxido de hidrogênio intracelular nas culturas da cianobactéria para os tratamentos com os extratos de *P. stratiotes* (aquoso e etanólico) são mostrados nas Figuras 3 A e B respectivamente. A formação de H_2O_2

intracelular por *M. aeruginosa* para o extrato aquoso aumentou com o tempo de exposição. Para este extrato, a maior concentração de H_2O_2 (3,77 $\mu\text{mol/g}$) foi observada no 6º dia. Além disso, os níveis de H_2O_2 mensurados no 2º (apenas 500 mg/L), 4º e 6º dia com as três concentrações do extrato aquoso, foram significativamente ($p < 0,05$) maiores do que no controle, mesmo os diferentes tratamentos a partir deste período já estarem mostrando reduções significativas em suas densidades celulares (Figura 1A). Para os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato etanólico, não foram observadas alterações na produção de H_2O_2 quando comparado ao controle no 2º dia de tratamento. Apenas 250 mg/L a partir do 4º dia e 100 e 250 mg/L a partir do 6º dia foram significativamente ($p < 0,05$) superiores ao controle, ressaltando que a concentração de 250 mg/L no 6º dia já apresentava reduções significativas na sua densidade celular (Figura 1B). Para este extrato, também observou-se a maior concentração de H_2O_2 (3,19 $\mu\text{mol/g}$) no 6º dia de tratamento.

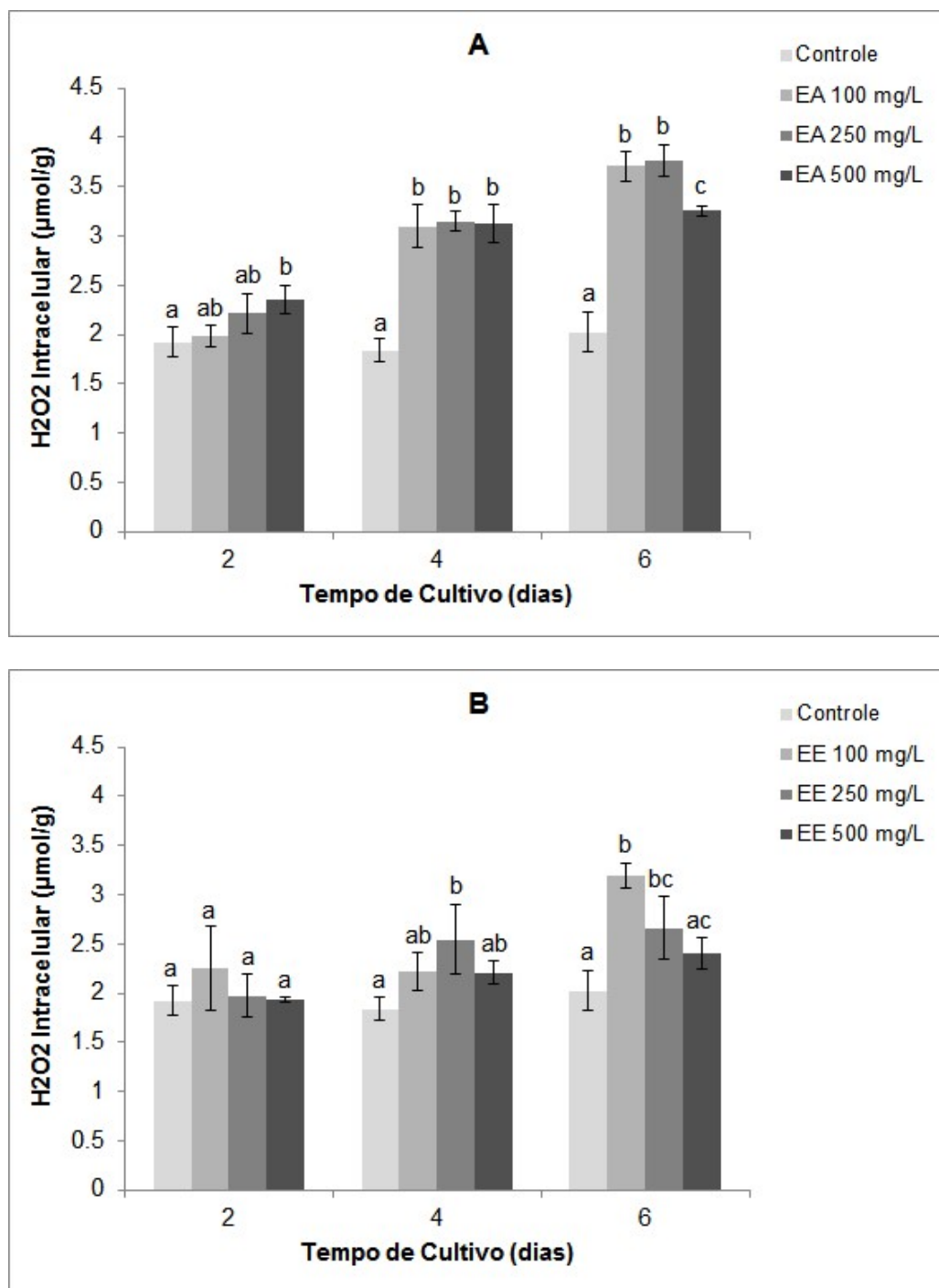


Figura 3. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* no conteúdo de H_2O_2 intracelular em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos ‘a’, ‘b’, e ‘c’ representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

3.4 Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes

Os resultados obtidos para a produção total de proteínas para os tratamentos com os extratos de *P. stratiotes* estão apresentados na figura 4 A e B. As concentrações de proteínas totais diminuíram com a adição dos extratos de *P. stratiotes*. Esta redução foi

significativamente superior ($p < 0,05$) na maior concentração utilizada (500 mg/L) de extrato etanólico em todos os dias de tratamento em comparação com o controle, mostrando um perfil de resposta dose-dependente. O valor máximo de proteína total para ambos os extratos foi obtido no 6º dia de tratamento, sendo 54,11 e 35,95 $\mu\text{g/mL}$, para o extrato aquoso e etanólico respectivamente.

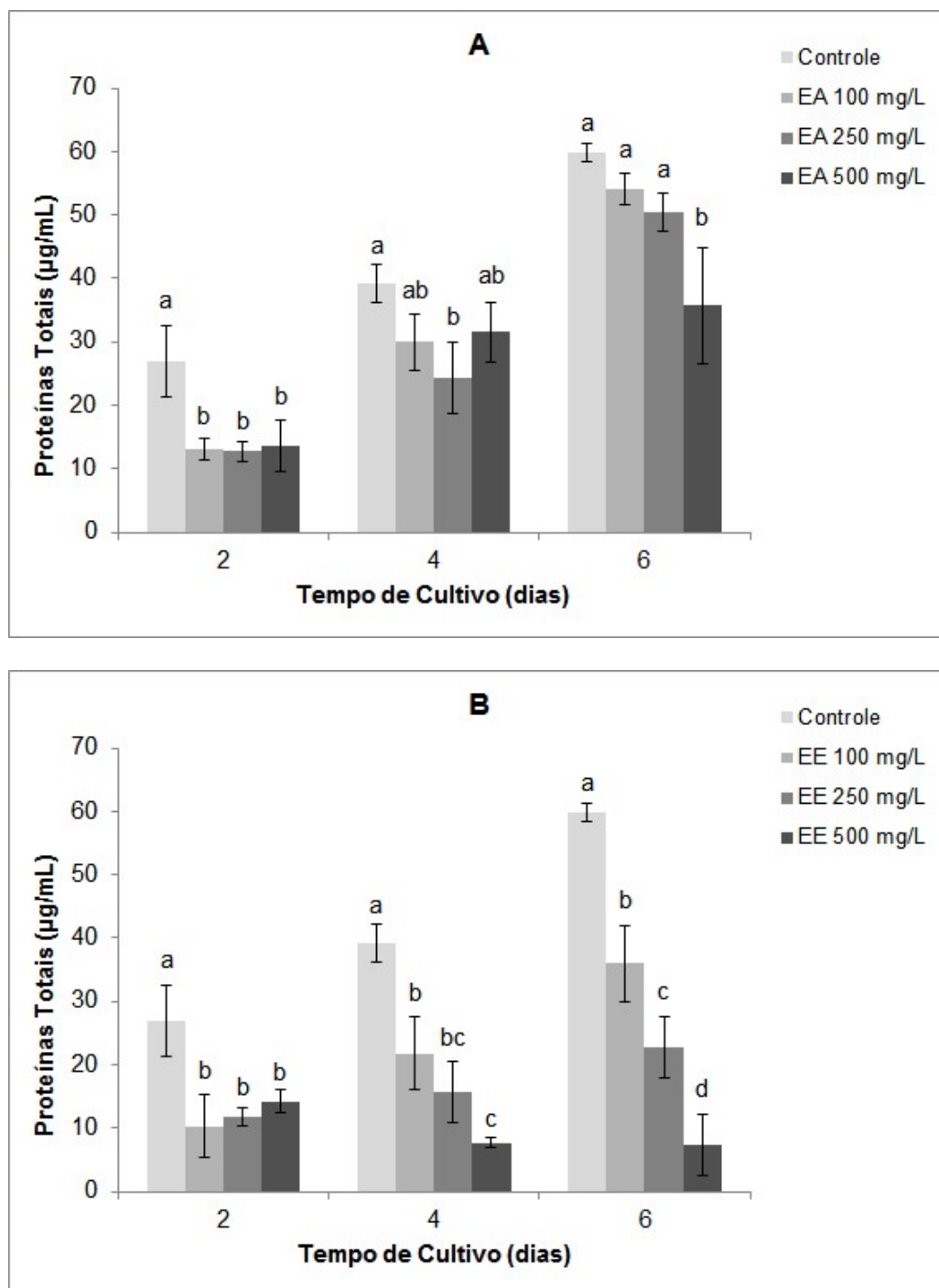


Figura 4. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* no conteúdo de proteínas totais em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

A atividade da catalase (CAT) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a partir do 2º dia de tratamento para as diferentes concentrações em ambos os extratos em relação ao grupo controle. As maiores atividades de CAT foram 0,61 e 0,48 U/mL observadas no 6º dia de exposição para o extrato aquoso e etanólico respectivamente (Figuras 5A e B).

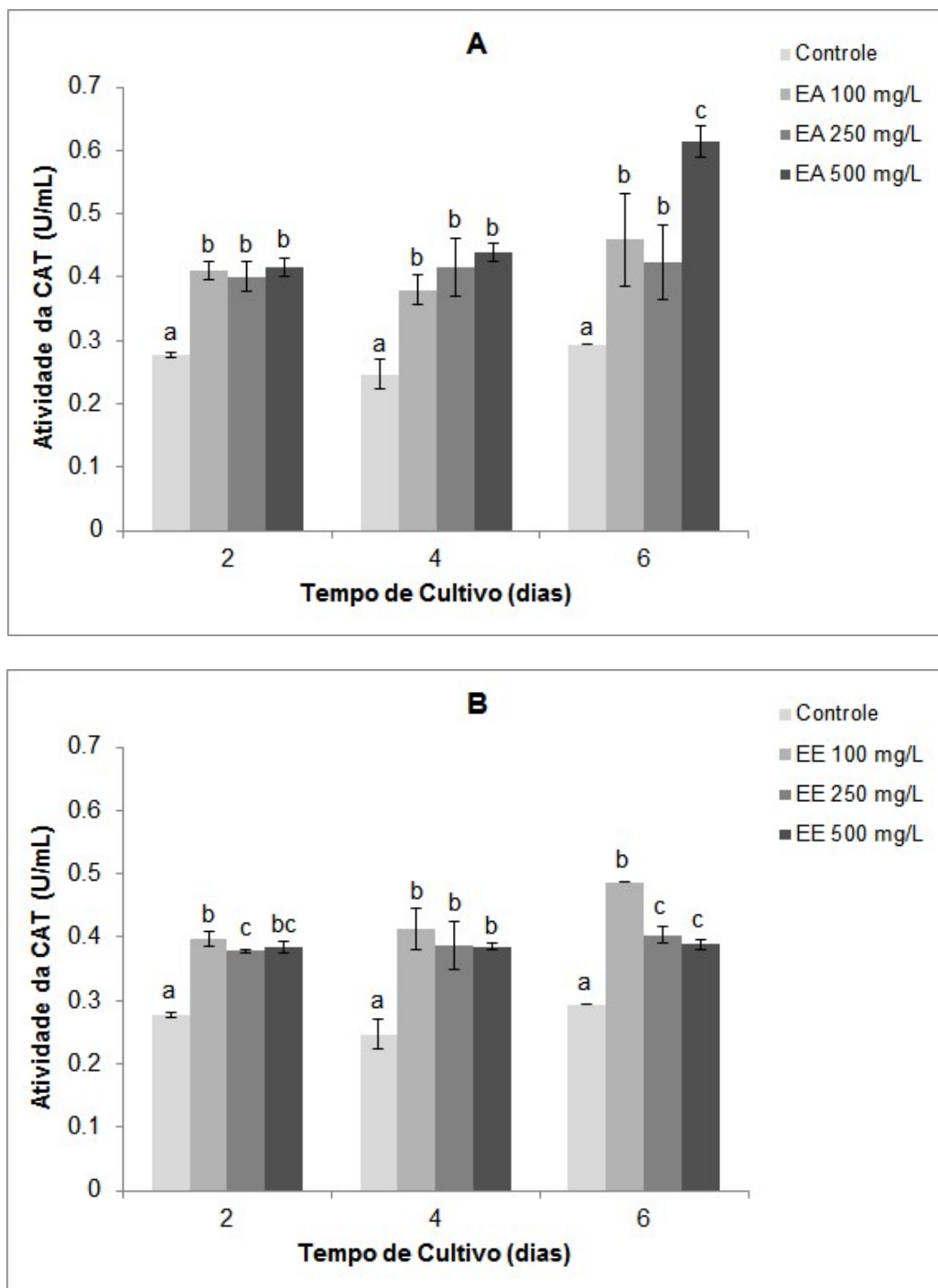


Figura 5. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. striotenes* na atividade da Catalase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', e 'c' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Podem ser observadas na Figura 6 A e B as mudanças na atividade da enzima peroxidase (POD). Os resultados obtidos mostraram que as diferenças nas atividades enzimáticas entre os grupos controle e os tratamentos com os extratos de *P. stratiotes* foram significativas e visíveis após o 2º dia de tratamento. O valor máximo de atividade da POD foi 0,05 (6º dia) e 0,03 (2º dia) U/mL, para o extrato aquoso e etanólico respectivamente.

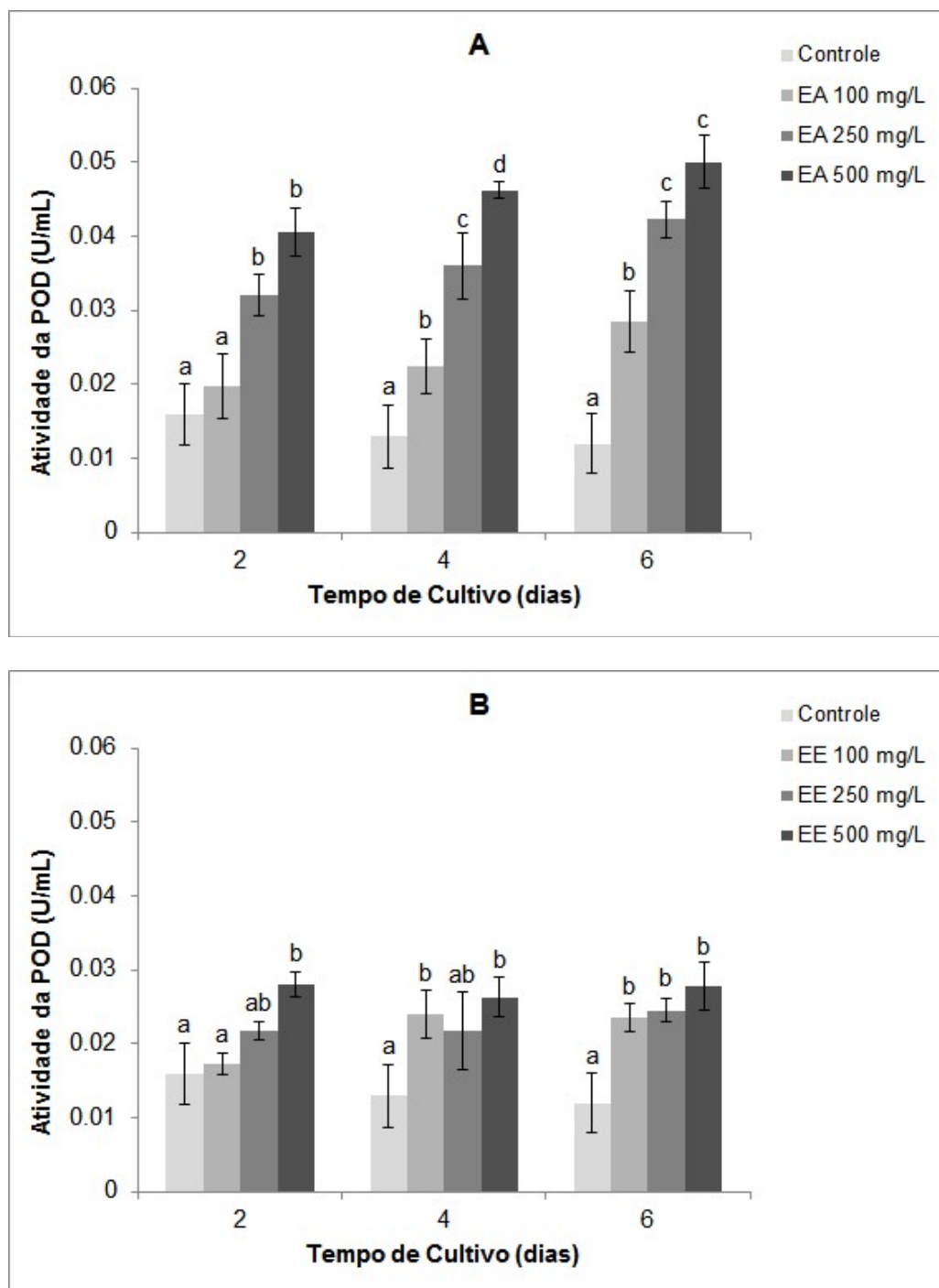


Figura 6. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* na atividade da Peroxidase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Para a enzima superóxido dismutase (SOD) foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade dos 2º, 4º e 6º dias de tratamento para ambos os extratos nas diferentes concentrações em comparação com o controle (Figura 7).

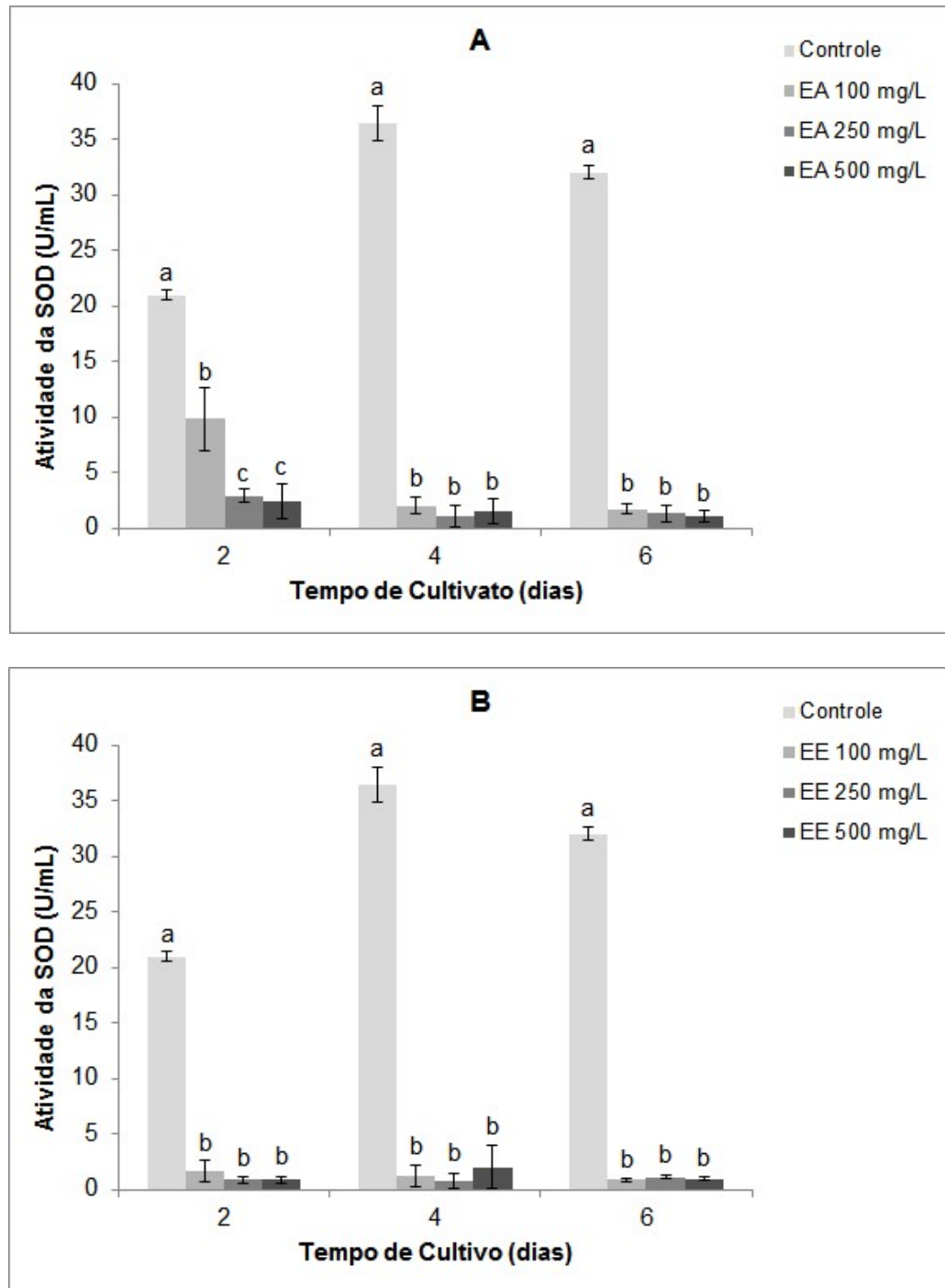


Figura 7. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* na atividade da Superóxido dismutase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', e 'c' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

A Figura 8 mostra a atividade da Glutathione-S-transferase (GST) para os dois extratos utilizados e suas diferentes concentrações, onde para o extrato aquoso nas diferentes concentrações utilizadas ocorreram oscilações na atividade enzimática, porém não havendo diferença entre as diferentes concentrações e o controle nos 2º e 4º dias de tratamento. Já para o 6º dia de tratamento, as concentrações de 100 e 250 mg/L foram elevadas significativamente ($P < 0,05$) quando comparadas com o grupo controle. Para o extrato etanólico não houve diferença entre as concentrações de extrato utilizadas e o grupo controle no 2º e 6º dias, no entanto, para o 4º dia ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de GST para as duas maiores concentrações utilizadas (250 e 500 mg/L).

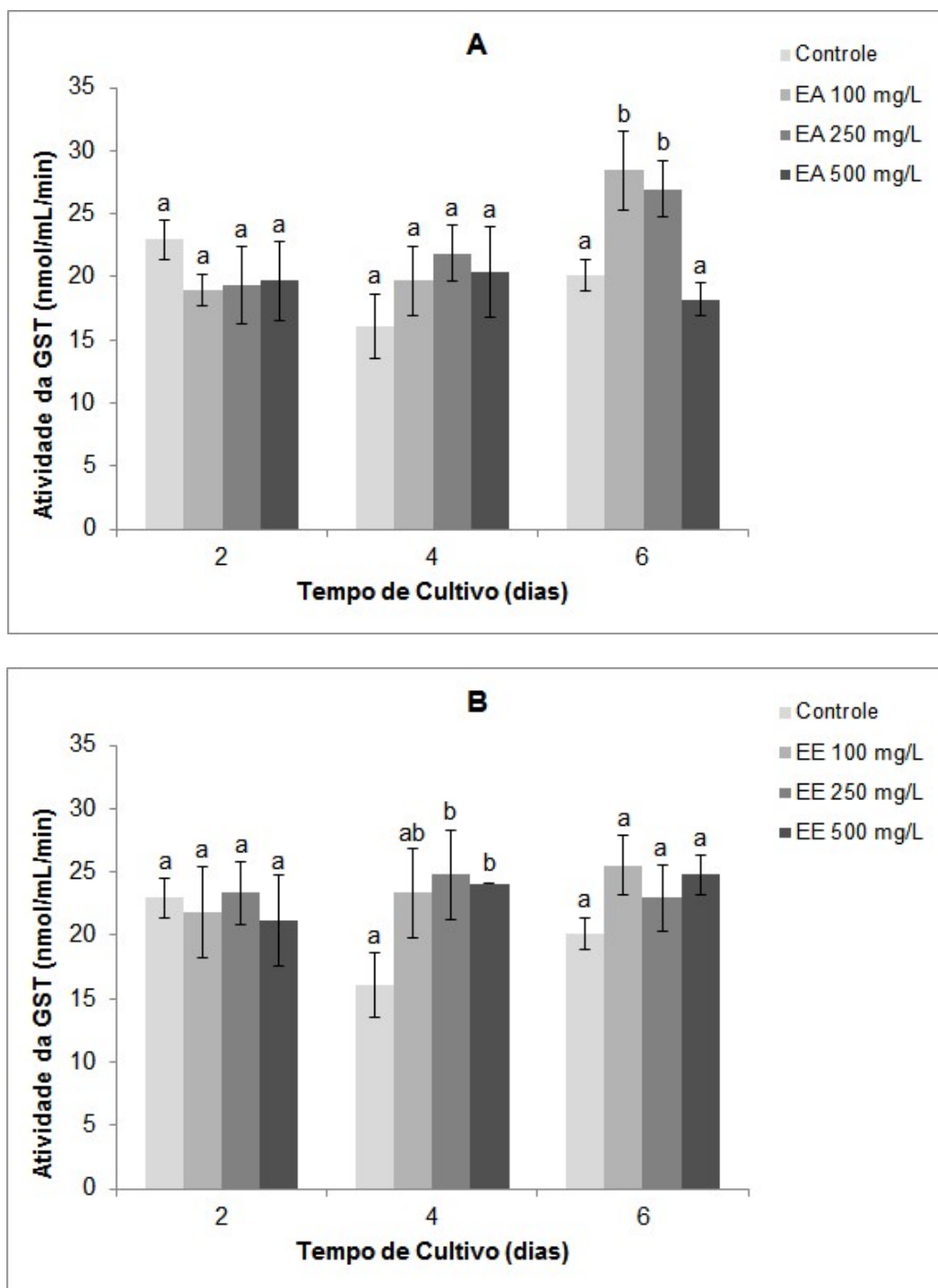


Figura 8. Efeito do A) extrato aquoso (AE) e B) extrato etanólico (EE) de *P. stratiotes* na atividade da Glutathione S-transferase (GST) em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

3.5 Determinação de Fenóis e Flavonoides

Para os resultados da determinação de polifenóis totais, verificou-se no extrato etanólico uma concentração de 93.36 μg em equivalência à ácido gálico por miligrama de extrato seco e 217.33 μg em equivalência de rutina por miligrama de extrato seco para o teste de flavonoides

totais. Já para o extrato aquoso foi verificado 5.19 µg em equivalência de ácido gálico por miligrama de extrato seco para o teste de polifenóis totais e 11.02 µg em equivalência de rutina por miligrama de extrato seco para o teste de flavonoides.

3.6 Avaliação da atividade pró-oxidativa pela degradação da Albumina Sérica Bovina (BSA)

Não foi possível verificar a atividade pró-oxidativa tanto do extrato aquoso quanto do etanólico para as concentrações utilizadas quando as mesmas foram comparadas com o controle negativo e positivo (Figura 9).

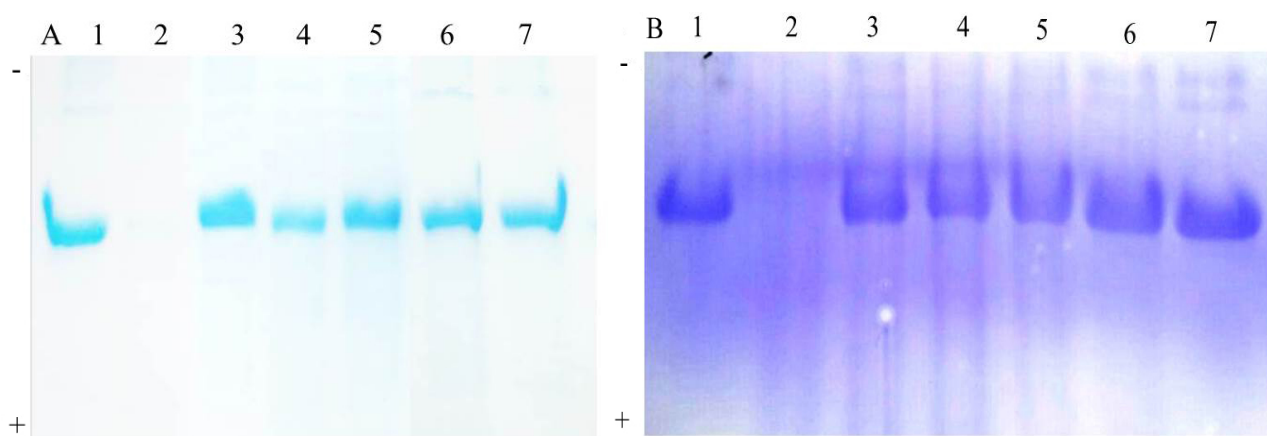


Figura 9 – Visualização do gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue mostrando a degradação oxidativa da BSA. (A) Extrato Aquoso; 1- BSA (controle); 2- BSA+Cu+H₂O₂ (controle positivo); 3- BSA+Cu; 4- BSA+Cu+EA 1000 µg/mL; 5- BSA+Cu+EA 500 µg/mL; 6- BSA+Cu+EA 100 µg/mL; 7- BSA+Cu+EA 10 µg/mL. (B) Extrato Etanólico; 1- BSA (controle); 2- BSA+Cu+H₂O₂ (controle positivo); 3- BSA+Cu; 4- BSA+Cu+EE 1000 µg/mL; 5- BSA+Cu+EE 500 µg/mL; 6- BSA+Cu+EE 100 µg/mL; 7- BSA+Cu+EE 10 µg/mL.

4 DISCUSSÃO

O bioensaio sobre cultura da cianobactéria *M. aeruginosa* BCCUSP232 exposta aos extratos de *Pistia stratiotes* mostrou uma alteração significativa em seu crescimento, refletindo na sua densidade celular. A densidade celular apresentou perfil semelhante para ambos os extratos (aquoso e etanólico), com redução da densidade celular na maior concentração. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por YE et al. (1999), LI e HU (2005), LIU et al. (2011) e WU et al. (2013) que utilizaram extratos de outros vegetais para controle de cianobactérias. Em um estudo realizado por WU et al. (2013) que avaliou o efeito inibitório de quatro concentrações de extrato acetato de etila de *P. stratiotes* (1:20 g/mL) no crescimento de *M. aeruginosa*, a cepa começou a recuperar seu crescimento aproximadamente cinco dias após a adição do extrato, indicando uma diminuição do efeito

inibitório, assemelhando-se aos resultados observados no presente estudo. De acordo com KONG et al. (2006) e HONG e HU (2009) dependendo do tempo de exposição dos aleloquímicos em meio de cultura é possível constatar um processo de degradação ou transformação dos mesmos, interferindo diretamente na ação inibitória do extrato, tornando possível a retomada do crescimento de *M. aeruginosa*.

Para a determinação do H_2O_2 intracelular das cianobactérias, foi observada uma elevação da formação inicial de H_2O_2 após quatro dias da exposição aos extratos. De acordo com estudos realizados por RHOADS et al. (2006) e QIAN et al. (2012) o aumento de H_2O_2 está correlacionado diretamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). As espécies reativas de oxigênio tem sua produção intensificada significativamente em organismos fotossintéticos que sofrem exposição ao estresse ambiental e/ou exógeno. Além disso, a elevada produção de H_2O_2 aumenta o risco de dano oxidativo para a célula, resultando em danos a diversas estruturas relacionadas aos cloroplastos, redução nos níveis de clorofila a e, conseqüentemente uma redução do potencial fotossintético (DUMMERMUTH et al. (2003), TORRES et al. (2008) e MIKULA et al. (2012). Estas conseqüências poderiam estar correlacionadas também com o declínio na densidade celular observada neste estudo.

Para a determinação da peroxidação lipídica foi avaliada a formação de malondialdeído, pois de acordo com HONG et al. (2008), SHAO et al. (2011), WANG et al. (2011) e ZHOU et al. (2016) este reativo comporta-se como um biomarcador para danos oxidativos causados na membrana lipídica das células de cianobactérias. De acordo com os resultados obtidos para ambos os extratos utilizados, foi possível observar que o conteúdo de MDA aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração e do tempo de exposição aos extratos. Diante disso, tal resultado revelou alterações na peroxidação lipídica em *M. aeruginosa* expostas a diferentes concentrações dos extratos de *P. stratiotes*, sendo que este fato pode, também, estar diretamente correlacionado com efeito inibitório sobre o crescimento da cianobactéria. YU e MATSUI (1997) e LI e HU (2005) demonstraram em seus estudos que determinados aleloquímicos causaram lesões nas membranas celulares, principalmente devido a desequilíbrio nos canais iônicos, resultando em alterações na permeabilidade da membrana e comprometendo a integridade da mesma. Este fato também pode justificar os resultados observados no presente estudo, os quais são corroborados com estudos realizados por MENG et al. (2015) e LI et al. (2016) que utilizaram extratos de *Ailanthus altissima* e *Sagittaria trifolia* sobre populações de *M. aeruginosa*.

Na quantificação de proteínas totais intracelular, obteve-se uma diminuição no seu conteúdo em comparação com o controle após o 2º dia de tratamento. Esta redução na

proteína total intracelular obtida a partir das culturas de *M. aeruginosa* esteve principalmente relacionada com a diminuição da densidade celular causada pela ação algistática dos diferentes extratos de *P. stratiotes*. Além disso, observou-se o possível envolvimento de diferentes compostos presentes nos extratos, pois estes podem variar de acordo com o solvente utilizado, justificando as diferentes respostas na presença dos extratos (LI e HU 2004; SOPHIE et al., 2008).

Na determinação das concentrações de POD e CAT, foi possível observar que as atividades de ambas foram elevadas de acordo com o aumento do H_2O_2 interno. Segundo QIAN et al. (2012), estas enzimas sequestram o excesso de H_2O_2 produzido em *M. aeruginosa* e em outros organismos fotossintéticos, produzindo água e oxigênio, fato que pode explicar o aumento destas enzimas nas diferentes concentrações e no tempo de exposição aos extratos. Os resultados deste estudo estão de acordo com HONG et al. (2009) e LI et al. (2016) que demonstraram que a exposição de *M. aeruginosa* para extratos vegetais resultou em um aumento na atividade de POD e CAT. Além disso, estas enzimas possuem um largo espectro de especificidade para o substrato, incluindo compostos fenólicos, o ácido fórmico, formaldeído, indol, pirogalol e catecol, principais xenobióticos oxidantes em plantas (MURPHY et al., 2000).

A SOD é uma enzima que converte o superóxido em oxigênio livre e peróxido de hidrogênio, e este último é convertido em água e oxigênio pela ação da POD e CAT (MISHRA et al. 1993; QURESHI et al. 2007). Portanto, a SOD tem sido apontada como a primeira linha de defesa contra os ROS (HASSAN e SCANDALIOS, 1990). HONG et al. (2009) e MENG et al. (2015) demonstraram que compostos de origem vegetal em alta concentração e, dependendo do tempo de exposição, poderiam enfraquecer ou danificar o sistema de defesa antioxidante inativando a SOD, portanto, colaborarem para ação algicida e/ou algistática. Sendo assim, os teores de SOD observados no presente trabalho, nos tratamentos com os diferentes extratos, apresentaram-se inferiores aos observado no controle, independentemente do tempo de exposição e da concentração de extrato utilizado. Desta forma, os resultados sugerem que este pode ser um importante sítio de ação dos aleloquímicos de *P. stratiotes* em *M. aeruginosa*, pois de acordo com ZHANG et al. (2007), o acentuado declínio da atividade SOD pode causar danos às proteínas enzimáticas, devido ao acúmulo de radicais e peróxidos livres, resultando na redução no teor de proteínas totais acima descritos e na inibição do crescimento da cianobactéria.

O aumento da atividade de GST em resposta à presença dos extratos no sexto dia de exposição significa que a mesma pode estar envolvida na biotransformação e/ou a

desintoxicação produzida pelos extratos. Isto ocorre como uma medida de proteção contra os danos oxidativos. Esta biotransformação ou desintoxicação é conseguida por um processo de conjugação que utiliza a forma reduzida de glutathione (GSH), catalisada pela GST (VESTENA et al., 2011; CHIA et al., 2015). Além disso, estudos anteriores realizados por BÁRTOVA et al. (2011) e HA e PFLUGMACHER (2013 a, b) demonstraram que esta enzima é capaz de biotransformar e desintoxicar cianobactérias, espécies de fitoplâncton e as plantas vasculares contra ação de toxinas e compostos oxidativos.

Além do estudo dos mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelos extratos, e a fim de elucidar o possível mecanismo de ação algicida e/ou algistático dos mesmos, foram também realizados os testes de degradação oxidativa da albumina sérica bovina e quantificação de polifenóis. Para os extratos avaliados não foi possível observar atividade de degradação oxidativa promovida pelos extratos de acordo com a metodologia utilizada, porém a determinação de polifenóis demonstrou uma considerável quantidade destes compostos na concentração do extrato com maior atividade algistática. Esse ultimo resultado é corroborado por estudos realizados por BAUER et al. (2009), GROSS e GENE (2009), WU et al. (2013) e ZHANG et al. (2010 e 2013), os quais demonstraram que aleloquímicos extraídos de várias plantas aquáticas vem sendo confirmados como inibidores do crescimento de algas e cianobactérias, sendo atribuído principalmente aos polifenóis esse efeito inibitório. O potencial fitotóxico de muitos compostos, entre eles os fenólicos e flavonoídicos é reconhecido por inibir a fotossíntese e induzir ao aumento da produção de ROS que, por sua vez, podem afetar a permeabilidade da membrana, promover danos ao DNA e às proteínas e provocar a peroxidação lipídica, conduzindo à morte celular (CZARNOTA et al. 2001; YU et al. 2003; ZHANG et al. 2010).

5 CONCLUSÃO

P. stratiotes apresenta potencial para controle de populações de cianobactérias uma vez constatada a ação algistática exercida em cultura dessas cianobactérias. Isso sugere que o mecanismo de ação pode estar relacionado com o estresse oxidativo, pois houve alterações nas enzimas relacionadas ao equilíbrio oxidativo, principalmente na SOD. Estes efeitos podem estar associados ao conteúdo polifenólico encontrado nos extratos avaliados de *P. stratiotes*, onde estudos futuros serão realizados a fim de elucidar estes aleloquímicos.

REFERÊNCIAS

- ALIOTTA, G.; MONACO, P.; PINTO, G.; POLLIO, A.; PREVITERA, L. Potential Allelochemicals from *Pistia Stratiotes* L. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 17, p. 2223-2234, 1991.
- BARROS, S.; GERALDES, A. M.; FERNANDES, C. Avaliação do potencial algicida e algistático de extractos vegetais em *Chlorella vulgaris* e *Anabaena cylindrica*. **CAPTAR Ciência e Ambiente para Todos**, v. 3, p. 30-39, 2011.
- BÁRTOVA, K.; HILSCHEROVA, K.; BABICA, P.; MARSÁLEK, B.; BLÁHA, L. Effects of microcystin and complex cyanobacterial samples on the growth and oxidative stress parameters in green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and comparison with the model oxidative stressor-herbicide paraquat. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 641–648, 2011.
- BAUER, N.; BLASCHKE, U.; BEUTLER, E.; GROSS, E. M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; HILT, S. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. **Aquatic Botany**, v. 91, p. 110–116, 2009.
- BICH, T. T. N.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. **Aquatic Botany**, v. 103, p. 30–36, 2012.
- 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, p. 209-216, 2011.
- BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Influência alelopática de *Phytollaca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Biotemas**, v. 22, p. 67-75, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 243-254, 1976.
- CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**, São Carlos: Rima, 2006.
- CARNEIRO, T. G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, v. 32, p. 36-41, 2007/2008.
- CHIA, M. A.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Growth and antioxidant response of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) exposed to anatoxin-a. **Harmful Algae**, v. 49, p. 135–146, 2015.
- CZARNOTA, M. A.; PAUL, R. N.; DAYAN, F. E.; NIMBAL, C. I.; WESTON, L. A. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology**, v. 15, p. 813–825, 2001.

DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247–257, 2005.

DRABKOVA, M.; MATTHIJS, H. C. P.; ADMIRAAL, W.; MARSLEK, B. Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 45, p. 363–369, 2007.

DUMMERMUTH, A. L.; KARSTEN, U.; FISCH, K. M.; KONIG, G. M.; WIENCKE, C. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, p. 103–121, 2003.

FERRIER, M. D.; BUTLER, B. R.; TERLIZZI, D. E.; LACOUTURE, R.V. The effects of barley straw (*Hordeum vulgare*) on the growth of freshwater algae. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1788–1795, 2005.

GORHAM, P. R.; MCLACHLON, J. R.; HAMMER, V. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). *Breb. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, v. 15, p. 796–804, 1964.

GROSS, E. M.; GENE, E. L. Allelochemical reactions. LIKENS, G. E. (ed.). **Encyclopedia of inland waters**. Oxford: Academic Press, p. 715– 726, 2009.

HA, M. H.; PFLUGMACHER, S. Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum*. **Toxicon**, v. 70, p. 1–8, 2013a.

HA, M. H.; PFLUGMACHER, S. Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. **Aquatic Toxicology**, v. 138–139, p. 26–34, 2013b.

HOEGER, S. J.; SHAW, G.; HITZFELD, B. C.; DIETRICH, D. R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two australian drinking water treatment plants. **Toxicon**, v. 43, p. 639–49, 2004.

HASSAN, H. M.; SCANDALIOS, J. M. Superoxide dismutases in aerobic organisms. ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. (Eds.). **Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatation Mechanisms**. New York: Wiley-Liss, p. 175–199, 1990.

HEISLER, J.; GLIBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. M.; ANDERSON, D. M.; COCHLAN, W.; DENNISON, W. C. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. **Harmful Algae**, v. 8, p. 3–13, 2008.

HONG, Y.; HU, H.Y. Research and application of aquatic plant allelopathy inhibition on algae. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p. 287–293, 2009.

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

HONG, Y.; HU, H. Y.; XIE, X.; SAKODA, A.; SAGEHASHI, M.; LI, F. M. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 262–269, 2009.

HSIEH, C. L.; LIN, Y. C.; KO, W. S.; PENG, C. H.; HUANG, C. N.; PENG, R. Y. Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 357–363, 2005.

WANG, J.; ZHU, J. Y.; LIU, S. P.; LIU, B. Y.; GAO, Y. N. Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes. **Chemosphere**, v. 85, p. 977–982, 2011.

JANA, S.; CHOUDHURI, M. A. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. **Aquatic Botany**, v. 12, p. 345–354, 1982.

JHA, M.; SHARMA, V.; GANESH, N. Antioxidant and wound healing potential of *Pistia stratiotes* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 579–584, 2012.

JOHANSSON, L. H.; BORG, L. A. H. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. **Analytical Biochemistry**, v. 174, p. 331–336, 1988.

KONG, C. H.; WANG, P.; ZHANG, C. X. Herbicidal potential of allelochemicals from *Lantana camara* against *Eichhornia crassipes* and the alga *Microcystis aeruginosa*. **Weed Research**, v. 46, p. 290–295, 2006.

KOZDĘBA, M.; BOROWCZYK, J.; ZIMOLĄG, E.; WASYLEWSKI, M.; DZIGA, D.; MADEJA, Z.; DRUKALA, J. Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. **Toxicon**, v. 80 p. 38–46, 2014.

LI, F. M.; HU, H. Y. Isolation and effects on green alga *Chlorella pyrenoidosa* of algal-inhibiting allelochemicals in the macrophyte *Phragmites communis* Tris. **Chinese Journal of Environmental Science**, v. 25, p. 89–92, 2004.

LI, F. M.; HU, H. Y. Isolation and characterization of novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6545–6553, 2005.

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

LIANG, H.; NAN, J. Algae removal by ultrasonic irradiation–coagulation. **Desalination**, v. 239, p. 191–197, 2009.

LIU, G. T.; ZHOU, C. F.; SUN, L. F.; ZHU, W. W.; JIANG, H.; WANG, H. X. Effects of *Eichhornia crassipes* allelochemicals on the growth of two mono- and co-cultured algae *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 31, p. 2303–2311, 2011.

MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant science**, v. 157, p. 113–128, 2000.

MAUCH, F.; DUDLER, R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. **Plant Physiology**, v. 102, p. 1193–1201, 1993.

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

MIKULA, P.; ZEZULKA, S.; JANCULA, D.; MARSALEK, B. Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* – new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. **European Journal of Phycology**, v. 47, p. 195–206, 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical antioxygenation of haemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 6960–6962, 1972.

MISHRA, N. P.; MISHRA, R. K.; SINGHAL, G. S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. **Plant Physiology**, v. 102, p. 903–910, 1993.

MURPHY, C. D.; MOORE, R. M.; WHITE, R. L. Peroxidases from marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 507–513, 2000.

NARDINI, M. J.; NOGUEIRA, I. S. O processo antrópico de um lago artificial e o desenvolvimento da eutrofização e florações de algas azuis em Goiânia. **Estudos**, v. 35, p. 23–52, 2008.

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

OU, N.; GAO, Y.; DENG, Y.; QIAO, J. L.; WANG, H. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1241–1250, mar. 2012.

PAERL, H.W.; FULTON, R.S.; MOISANDER, P.H.; DYBLE, J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 76–113, 2001.

PETR, T. Interactions between fish and aquatic macrophytes in inland waters. A review. **FAO Fishers Technical Paper**, Rome: FAO, n. 396, 2000. 185 p.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá-MS); Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 404p.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, 4. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1995.

PUTRA, R. S.; CAHYANA, F.; NOVARITA, D. Removal of Lead and Copper from Contaminated Water Using EAPR System and Uptake by Water Lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 381–386, 2015.

QIAN, H.; PAN, X.; CHEN, J.; ZHOU, D.; CHEN, Z.; ZHANG, L.; FU, Z. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 847–859, 2012.

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1239–1260, 2007.

REDDY, J. K.; SUGA, T.; MANNAERTS, G. P.; LAZAROW, P. B.; SUBRAMANI, S. (eds.). **Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 804, New York, 1996.

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 366–375, 2006.

RIBEIRO, J. P. N.; MATSUMOTO, R. S.; TAKAO, L. K.; VOLTARELLI, V. M.; LIMA, M. I. S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p. 183–188, 2009.

SHAO, J. H.; XU, Y.; WANG, Z. J.; JIANG, Y. G.; YU, G. L.; PENG, X.; LI, R. H. Elucidating the toxicity targets of beta-ionone on photosynthetic system of *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (Cyanobacteria). **Aquatic Toxicology**, v. 104, p. 48–55, 2011.

SILVEIRA, A. L. **Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kutz.** 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2012.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

Sophie, D.; Christine, R.; Nicolas, P.; Arlette, C.; Régine, V. Allelopathic potential of two invasive alien *Ludwigia* spp. **Aquatic Botany**, v. 88, p. 311–316, 2008.

SPIROS, K.; ANTJE, S.; MICHIEL, P. Sonic cracking of blue-green algae. **Applied Acoustics**, v. 70, p. 1306–1312, 2009.

TERRY, P. J. Weeds and their control in the Gambia. **Tropical Pest Management**, v. 27, p. 44–52, 1981.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8715–8721, 2008.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M.; SOUZA, M. C.; KITA, K. K.; CAMARGO, A. F. M. Aquatic macrophytes of Itaipu Reservoir, Brazil: survey of species and ecological considerations. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, p. 15–22, 1999.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICCOLO, P. Biochemical markers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 1–15, 2008.

VESTENA, S.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidant enzyme response in water hyacinth and *Salvinia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 131–139, 2011.

WIUM-ANDERSEN, A.; ANTHONI, U.; HOUEN, G. Elemental sulphur, a possible allelopathic compound from *Ceratophyllum demersum*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2613, 1983.

WU, X.; WU, H.; CHEN, J.; YE, J. Effects of allelochemical extracted from water lettuce (*Pistia stratiotes* Linn.) on the growth, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science Pollution Research**, v. 20, p. 8192–8201, 2013.

YE, J. X.; HE, C. Q.; CHEN, S. F. Allelopathic effect of *Acorus tatarinowii* on algae growth. **Acta Phytocologica Sinica**, v. 23, p. 379–384, 1999.

YU, J. Q.; MATSUI, Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 817–827, 1997.

YU, J. Q.; YE, S. F.; ZHANG, M. F.; HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 129–139, 2003.

ZHANG, C.; YI, Y. L.; HAO, K.; LIU, G. L.; WANG, G. X. Algicidal activity of *Salvia miltiorrhiza* Bung on *Microcystis aeruginosa*—towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism. **Chemosphere**, v. 93, p. 997–1004, 2013.

ZHANG, F. Q.; WANG, Y. S.; LOU, Z. P.; DONG, J. D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, v. 67, p. 44–50, 2007.

ZHANG, T. T.; ZHENG, C. Y.; HU, W.; XU, W. W.; WANG, H. F. The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 71–77, 2010.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZHOU, S.; YIN, H.; TANG, S.; PENG, H.; YIN, D.; YANG, Y.; LIU, Z.; DANG, Z. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 214–221, 2016.

ZIMMELS, Y.; KIRZHNER, F.; MALKOVSKAJA, A. Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. **Journal of Environmental Management**, v. 81, p. 420–428, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Ambos os extratos de *Pistia stratiotes* inibiram o crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 produtora de cianotoxina, principalmente nas maiores concentrações utilizadas.
- As alterações observadas para os compostos e enzimas relacionadas ao metabolismo de respostas ao estresse oxidativo da cianobactéria, demonstraram que os extratos de *Pistia stratiotes* agiram como estressores no metabolismo da mesma.
- O conteúdo polifenólico encontrado nos extratos pode ser o responsável pela atividade inibitória no crescimento de cianobactérias, devido ao potencial fitotóxico encontrado na literatura para a presença destes compostos vegetais.
- Em suma, ambos os extratos apresentaram atividade algistática, dentro das concentrações avaliadas, sugerindo que os mesmos são fontes de compostos que proporcionam estresse oxidativo e a peroxidação lipídica as cianobactérias, processos estes de interesse ao controle populacional destes microrganismos.