

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE COMPOSTOS INORGÂNICOS, HERBICIDAS E
EXTRATOS FOLIARES NO DESENVOLVIMENTO DE
Microcystis aeruginosa E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA**

LEANDRO TROPALDI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro-2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE COMPOSTOS INORGÂNICOS, HERBICIDAS E
EXTRATOS FOLIARES NO DESENVOLVIMENTO DE
Microcystis aeruginosa E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA**

LEANDRO TROPALDI

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro-2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Tropaldi, Leandro, 1987-
T856e Efeito de compostos inorgânicos, herbicidas e extratos
foliares no desenvolvimento de *Microcystis aeruginosa* e
produção de microcistina / Leandro Tropaldi. - Botucatu :
[s.n.], 2015
vi, 87 f. : grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015
Orientador: Edivaldo Domingues Velini
Inclui bibliografia

1. Água - Qualidade. 2. Cianobactéria. 3. Microcistinas.
4. Algas - Controle. 5. Produtos naturais. I. Velini, Edi-
valdo Domingues. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciên-
cias Agrônômicas. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÔNOMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITO DE COMPOSTOS INORGÂNICOS, HERBICIDAS E EXTRATOS FOLIARES NO DESENVOLVIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA"

AUTOR: LEANDRO TROPALDI

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI

Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES BUENO TRINDADE GALO

Departamento de Cartografia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Prof. Dr. RICARDO LUIS ARAÚJO DIAS

Diretoria Técnica de Científica - Grupo Centroflora

Prof. Dr. ANTONIO LUIZ CERDEIRA

Embrapa Meio Ambiente - Jaguariuna

Data da realização: 27 de novembro de 2015.

Aos meus pais, *Tertuliano Tropaldi* e *Dirce Zili Tropaldi*

Ao meu irmão, *Uélito Tropaldi*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini pela orientação, amizade e dedicação durante o período de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari e a Dra. Maria Lúcia Bueno Trindade pelas inúmeras contribuições.

Ao Dr. Tiago Henrique Rombola e aos técnicos de laboratório José Roberto Marques Silva, José Guilherme Ferreira Cordeiro, Luis Marcelo Siono, Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti e Iara Aparecida de Oliveira Brito pelo auxílio no desenvolvimento dos ensaios.

Ao Técnico Agrícola Elder Cândido de Mattos por ter colaborado na identificação das espécies nativas e na condução dos ensaios.

As doutorandas Ilca Puertas de Freitas Silva, Ivana Paula Ferraz Santos de Brito e Ana Karollyna Alves de Matos pela amizade e colaboração na realização das análises de clorofila.

Ao Prof. Dr. Armando A. H. Vieira por ter cedido gentilmente a cepa de *Microcystis aeruginosa* utilizada para o desenvolvimento desta Tese.

A Profa. Dra. Magali Ribeiro da Silva por ter cedido às espécies arbóreas nativas utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Bueno Trindade Galo (FCT/Unesp, Presidente Prudente/SP), ao Psq. Dr. Antonio Luiz Cerdeira (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP) e ao Dr. Ricardo Luiz Araújo Dias (Grupo Centroflora, Botucatu/SP) pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos meus amigos: Rosilaine Araldi, Natália Corniani, Rubiana Falopa Rossi, Diógenes Martins Bardivieso, Marcelo Giroto, Jaine Aparecida de Camargo Dias, Susiane de Moura Cardoso, Bruna Barboza Marchesi, Carolina Pucci de Moraes, Diego Belapart, obrigado pelo apoio e contribuição.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) e à Faculdade de Ciências Agronômicas, representada pelos seus funcionários e colaboradores, pela oportunidade de formação.

A CAPES por ter concedido a bolsa de doutorado.

A todos que direta e indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1 Características gerais das cianobactérias	7
4.2 Ocorrência e impactos de cianobactérias tóxicas.....	8
4.3 Métodos de monitoramento de cianobactérias tóxicas	12
4.3 Métodos de controle de cianobactérias tóxicas.....	13
5 MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 Cepa e condições de cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	18
5.2 Estudo 1: Triagem do efeito de diferentes substâncias com ou sem ação herbicida conhecida no controle de <i>M. aeruginosa</i>	19
5.3 Estudo 2: Efeito de diferentes concentrações de herbicidas com potencial de controle de <i>M. aeruginosa</i>	21
5.4 Estudo 3: Efeito do sulfato de cobre e hipoclorito de sódio no controle de <i>M. aeruginosa</i>	21
5.5 Estudo 4: Eficiência de diferentes concentrações de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de <i>M. aeruginosa</i>	21
5.6 Estudo 5: Efeito de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de <i>M. aeruginosa</i> em altas densidades.....	22
5.7 Estudo 6: Triagem do efeito de biomassa foliar de espécies nativas e adubos verdes no controle de <i>M. aeruginosa</i>	22
5.7 Estudo 7: Curva dose-resposta de biomassa foliar das espécies mais promissoras...	26
5.9 Estudo 8: Variabilidade do efeito da biomassa foliar de plantas individuais de <i>Guatteria australis</i> e <i>Pterogyne nitens</i> no controle de <i>M. aeruginosa</i>	26
5.10 Determinação do teor de clorofila α	27
5.11 Determinação do teor de microcistina LR	29
5.12 Análise estatística	30

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1 Estudo 1: Triagem do efeito de diferentes substâncias com ou sem ação herbicida conhecida no controle de <i>M. aeruginosa</i>	32
6.2 Estudo 2: Efeito de diferentes concentrações de herbicidas com potencial de controle de <i>M. aeruginosa</i>	38
6.3 Estudo 3: Efeito do sulfato de cobre e hipoclorito de sódio no controle de <i>M. aeruginosa</i>	42
6.4 Estudo 4: Avaliação da eficiência de dosagens de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de <i>Microcystis aeruginosa</i>	45
6.5 Estudo 5: Efeito de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de <i>M. aeruginosa</i> em altas densidades.....	49
6.6 Estudo 6: Avaliação do efeito de biomassa foliar de espécies nativas e adubos verdes no controle de <i>M. aeruginosa</i>	54
6.7 Estudo 7: Curva dose-resposta de biomassa foliar das espécies mais promissoras...	65
6.8 Estudo 8: Variabilidade do efeito da biomassa foliar de plantas individuais de <i>Guatteria australis</i> e <i>Pterogyne nitens</i> no controle de <i>M. aeruginosa</i>	70
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE	85
APÊNDICE 1: Estrutura química das substâncias testadas em <i>M. aeruginosa</i>	86

1 RESUMO

A qualidade da água de muitos corpos hídricos superficiais tem sido comprometida devido à ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas. Muitas espécies, incluindo a *Microcystis aeruginosa* produzem toxinas naturais, como as microcistinas, que geram grandes riscos ambientais e à saúde pública. Assim, a adoção de medidas que visem o controle das florações é necessária. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes tipos de substâncias e biomassas foliares sobre o desenvolvimento de *M. aeruginosa* e na produção de microcistina LR, tendo em vista a necessidade de produzir informações que possam subsidiar programas de manejo de florações. Dentre os compostos testados, o diquat, o diuron e o sulfato de cobre foram mais efetivos em reduzir o teor de clorofila α e o acúmulo de microcistina LR. Nos estudos com teor inicial de clorofila α de $0,5\text{mg L}^{-1}$ o diquat demonstrou elevado potencial de controle de *M. aeruginosa* nas concentrações de 0,1 e $0,2\text{mg L}^{-1}$. O diuron foi mais efetivo em reduzir os teores de microcistina LR total do que em reduzir os teores de clorofila α , apresentando reduções nos teores de microcistinas LR superiores a 75% em todas as concentrações avaliadas. O sulfato de cobre utilizado na concentração de $0,2\text{mg L}^{-1}$ foi efetivo na redução dos teores de clorofila α e microcistina LR total. Para esses compostos, a eficiência foi menor quando a aplicação ocorreu em unidades experimentais com clorofila α ($3,34\text{mg L}^{-1}$). Porém, ficou evidente que mesmo se os compostos controlassem efetivamente a *M. aeruginosa*, reduzindo o teor de clorofila α , a microcistina LR seria preservada e liberada na água, portanto, o controle deve ser feito precocemente para evitar que grandes quantidades da

toxina sejam acumuladas. Dentre as biomassas foliares avaliadas, as espécies arbóreas nativas *Guatteria australis* e *Pterogyne nitens* foram selecionadas por serem mais efetivas em reduzir o teor de clorofila α e o acúmulo de microcistina LR total, demonstrando potencial para o controle de *M. aeruginosa* com DL_{50} de 29,6 e 33,7mg L⁻¹, respectivamente. Quando as biomassas de diferentes indivíduos das duas espécies foram avaliadas isoladamente, os resultados demonstraram expressiva variabilidade no potencial de controle, evidenciando que a eficiência de uso das biomassas pode ser elevada com a seleção de plantas com maior potencial de controle e a necessidade de uso de amostras compostas nos estudos iniciais.

Palavras-chave: **qualidade de água, cianobactéria, microcistina, algicida, composto natural.**

2 SUMMARY

EFFECT OF INORGANIC COMPOUNDS, HERBICIDES AND PLANT EXTRACTS IN THE DEVELOPMENT OF *Microcystis aeruginosa* AND MICROCYSTIN PRODUCTION. Botucatu, 2015, 83p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LEANDRO TROPALDI

Adviser: DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

The water quality of many surface water bodies have been compromised due to occurrence of toxic cyanobacterial blooms. Many species, including *Microcystis aeruginosa* produce natural toxins, such as microcystins, which offer high risks to the environment and public health. Therefore, the adoption of measures to control blooms is required. This research aims to evaluate the effect of different types of substances and foliar biomass on the development of *M. aeruginosa* and producing microcystin-LR, in view of the need to produce information that can support blooms management programs. Effects of organic compounds, with or without known herbicide action, inorganic compounds biomass of Brazilian tree native species and green manure were evaluated on chlorophyll- α content and accumulation of microcystin-LR in *M. aeruginosa*. Among the tested compounds diquat, diuron and copper sulfate were most effective in reducing chlorophyll- α content and microcystin-LR accumulation. In studies with initial chlorophyll content of 0.5 mg L^{-1} diquat showed high potential to control *M. aeruginosa* at concentrations of 0.1 and 0.2 mg L^{-1} . Diuron was more effective in reducing the total microcystin-LR content than

chlorophyll- α content, showing reductions in microcystin content over 75% in all tested concentrations. Additionally, 0.2 mg L⁻¹ of copper sulfate reduced both the chlorophyll- α and total microcystin-LR content. For these compounds, the efficiency was lower in experimental units with greater cyanobacterial biomass (3.34 mg L⁻¹). However, it became apparent that even if the tested compounds effectively control the *M. aeruginosa*, reducing the chlorophyll α content, the microcystin-LR content would be maintained and released into water. Therefore, the control should be done early to avoid that large amounts of the toxin accumulate. Among the evaluated foliar biomass, the Brazilian native trees *Guatteria australis* and *Pterogyne nitens* were selected because they are more effective in reducing the chlorophyll- α and total microcystin-LR accumulation, demonstrating potential to control *M. aeruginosa* with DR₅₀ 29.6 and 33.7mg L⁻¹, respectively. When the biomass from different plants of the two species were evaluated separately, the results showed wide variability in the control potential, showing that the efficiency of biomass use can be high with the selection of plants with greater control potential and the need of composite samples for initial studies.

Key words: water quality, cyanobacteria, microcystin, algicide, natural compound.

3 INTRODUÇÃO

A falta de água doce de qualidade é uma das maiores preocupações em todo o mundo e, em virtude do atual cenário de escasseamento das fontes de águas subterrâneas, as populações têm se tornado cada vez mais dependentes das coleções superficiais de água para seu abastecimento. No entanto, o crescimento populacional e a intensificação das atividades agrícolas e industriais têm acelerado a eutrofização dessas fontes, lançando grandes quantidades de nutrientes que, entre vários outros problemas, tem contribuído para o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas.

Dentre as espécies de cianobactérias tóxicas, a *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Lemmermann possui ocorrência generalizada e é conhecida por ser grande produtora de microcistina, toxina solúvel e letal para muitos organismos aquáticos, animais superiores e seres humanos, devido aos seus efeitos hepatotóxicos. Por oferecer risco à saúde pública, a ocorrência dessas florações tornou-se um dos principais problemas de qualidade de água, exigindo o monitoramento e, quando necessário, a adoção de estratégias de controle.

Há consenso que a principal abordagem para a mitigação da ocorrência de cianobactérias está embasada em ações preventivas que visam minimizar o lançamento de nutrientes nos corpos d'águas. Porém, não raramente, estratégias que fazem uso de compostos químicos ainda são necessárias em muitos países para minimizar os prejuízos e riscos que essas florações oferecem.

Em decorrência dos sérios problemas que plantas aquáticas e florações de cianobactérias ocasionam em corpos hídricos e a atual necessidade de intervenções em alguns casos, mais recentemente, a resolução CONAMA nº467/2015

estabeleceu os critérios para autorização de uso de produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de microrganismos ou contaminantes em corpos hídricos superfícies (BRASIL, 2015). Sendo assim, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para verificar o impacto e/ou o efeito dos diferentes agentes de controles nos organismos alvos e no ecossistema.

Muitas substâncias já tiveram sua ação algicida reconhecida, todavia as consequências ecológicas de sua utilização precisa ser melhor compreendida. Um dos maiores riscos da ocorrência de florações de cianobactérias é a produção de cianotoxinas, entretanto, ainda são escassos os trabalhos que estudaram o efeito da exposição dos agentes de controle sobre a síntese e acumulação da toxina e na maioria dos casos se limitam apenas ao desenvolvimento da cianobactéria.

Um segundo ponto a ser explorado é o atual interesse pela utilização de estratégias ambientalmente mais seguras, como o uso de materiais naturais. Talvez uma das principais aplicações que se tem registro é a utilização de paha de cevada para a prevenção e controle de florações de cianobactérias em reservatórios. Portanto, a busca de materiais vegetais que possam ser utilizados como agentes de controle e/ou usados para identificação de compostos naturais ativos tem sido o objetivo de muitos pesquisadores.

Contudo, para a elaboração de estratégias de controle de florações é necessário uma abordagem complexa, que inclua todos os benefícios e prejuízos que possam ocorrer ao ecossistema. Sendo assim, avaliar os efeitos dos agentes de controle e seus impactos é essencial na definição de estratégias mais adequadas, assim como selecionar produtos e/ou desenvolver métodos alternativos.

Desse modo, o objetivo geral foi avaliar o efeito de diferentes tipos de substâncias e biomassas foliares sobre o desenvolvimento de *M. aeruginosa* e produção de microcistina LR, tendo em vista a necessidade de produzir informações que possam subsidiar programas de manejo de *M. aeruginosa*. Os objetivos específicos foram: a) avaliar o efeito de substâncias orgânicas e inorgânicas no controle *M. aeruginosa* e produção de microcistina LR; b) avaliar o efeito de diversas biomassas de arbóres nativas e adubos verdes no controle e na de *M. aeruginosa* e produção de microcistina LR; c) ajustar métodos para determinação de microcistina LR.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Características gerais das cianobactérias

As cianobactérias pertencem a um dos filos procariotos mais antigos do mundo, com registros fósseis datados de aproximadamente 3,5 bilhões de anos (WHITTON; POTTS, 2000). Elas são conhecidas como uns dos primeiros organismos primitivos a desenvolver fotossíntese no planeta, sendo então, consideradas como responsáveis pelo aumento gradual do teor de oxigênio da atmosfera necessário para o início do desenvolvimento da vida aeróbica (HEIDORN et al., 2011; SCHIRRMUSTER et al., 2011). De acordo com a Teoria Endosimbiótica, os cloroplastos de todos eucariotos fotoautotróficos (plantas e algas) são derivados de cianobactérias (FALCÓN; MAGALLÓN; CASTILLO, 2010; McFADDEN, 2014).

Esses microrganismos procariotos são muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente às bactérias (PRESCOTT et al., 1975). São constituídas por uma parede celular semelhante às das bactérias gram-negativas, uma membrana plasmática e o protoplasma, onde estão localizados os ribossomos 70s, a molécula de DNA, plasmídeos e os tilacóides que contém em seu interior pigmentos fotossintéticos (clorofila α , carotenoides e ficobilinas) e os fotossistemas I e II, todos fundamentais para a realização da fotossíntese em presença de oxigênio (LEE, 2008).

As cianobactérias formam um grupo de organismos com morfologia e fisiologia diversificada. Essas podem ser filamentosas ou cocóides, ocorrerem isoladamente ou em colônias, se fragmentarem por hormogônia (ou, por fissão binária) possibilitando a rápida dispersão e multiplicação, além de apresentarem alguns tipos de

células especializadas, como: heterocitos para a fixação de nitrogênio, aquinetos para a sobrevivência em condições de estresse (HEIDORN et al., 2011; GUPTA et al., 2013). Esses fatores contribuem para que sejam consideradas cosmopolitas e apresentem grande tolerância às condições ambientais e climáticas, podendo ser encontradas na maioria dos ecossistemas de água doce, marinho e terrestres, além de ambientes extremos, como fontes termais, neve e deserto (CARVALHO et al., 2013).

A literatura descreve aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias, com cerca de 2000 espécies identificadas, dentre as quais, pelo menos 40 são consideradas produtoras de toxinas (HITZFELD; HÖGER; DIETRICH, 2000; JAYALISSA et al., 2006).

4.2 Ocorrência e impactos de cianobactérias tóxicas

As cianobactérias são comumente encontradas em muitos ambientes aquáticos em baixas densidades. No entanto, quando se eleva as concentrações de nutrientes e em condições ambientais favoráveis, algumas espécies podem se multiplicar rapidamente, formando as chamadas “florações” na superfície da água que acarretam problemas ao ambiente e aos seres humanos (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A ocorrência de florações de cianobactérias pode acarretar grandes impactos ambientais por interferir no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, por meio da alteração da transparência e desoxigenação da coluna de água, além de alterar toda a estrutura da cadeia alimentar, podendo inclusive intoxicar animais silvestres e domésticos, uma vez que muitas espécies são produtoras de potentes toxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999). Mas, uma das maiores preocupações em todo o mundo se deve ao grande risco que a ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas em coleções superficiais de água oferece, principalmente naquelas que são utilizadas para o abastecimento urbano, constituindo assim, um risco para a saúde pública (APELDOORN et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

As toxinas produzidas por cianobactérias são genericamente denominadas de cianotoxinas e de acordo com seu modo de ação, podem ser classificadas em: hepatotoxina, neurotoxina e dermatoxina (CARVALHO, 2006). As hepatotoxinas são consideradas de maior relevância para o abastecimento de água e, nesse grupo estão incluídas as microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas, todas extremamente nocivas (CARVALHO, 2006).

Existem várias espécies de cianobactérias que são produtoras de hepatotoxinas, entre elas, o gênero *Microcystis*, em especial *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann células esféricas individuais, com diâmetro de 2-7 μ m que se replicam rapidamente em condições adequadas (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; SRIVASTAVA et al., 2013). Essa espécie é frequentemente encontrada em água doce, com relatos de ocorrência de florações em muitas coleções de águas de superfície, inclusive aquelas que são utilizadas para o abastecimento urbano em muitos países, incluindo o Brasil (NAKAGAWA; TAKAMURA; YAGI, 1987; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; CARVALHO et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2013). Portanto, essa é uma das espécies mais estudadas e mais problemáticas em todo o mundo.

Estruturalmente as microcistinas são heptapeptídeos cíclicos compostos por cinco aminoácidos comuns e dois variáveis (PEREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013). A estrutura geral cíclica da microcistina (D-alanina-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-glutamato-Mdha) está representada na Figura 1.

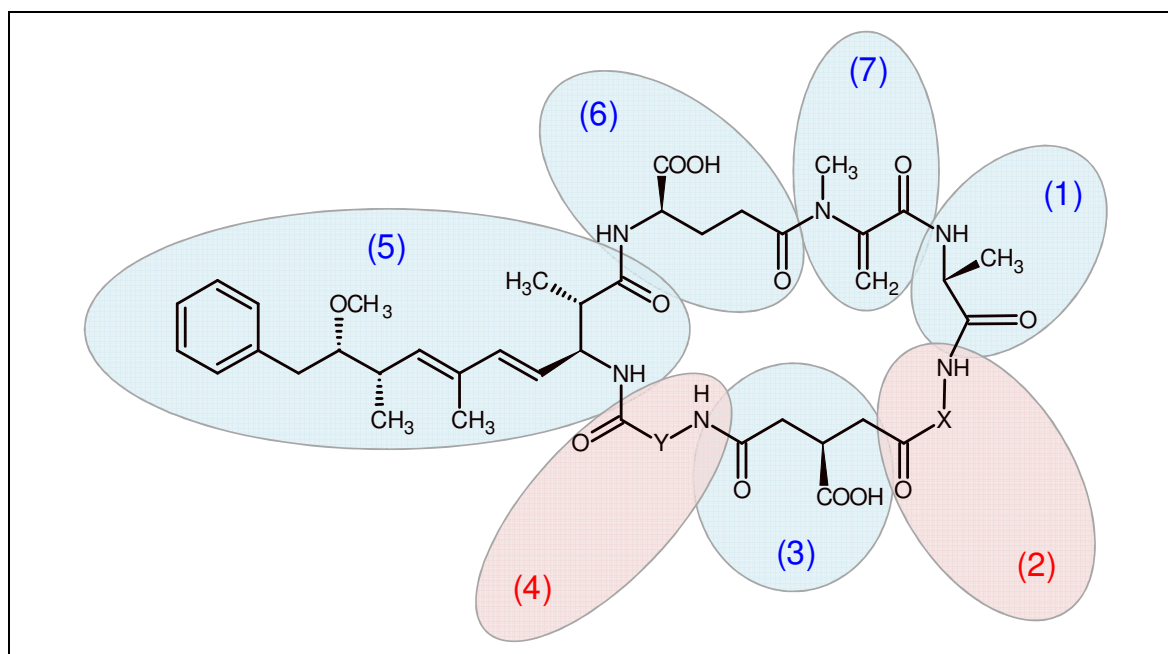


Figura 1. Estrutura química geral da microcistina. Em azul os aminoácidos comuns: D-alanina (1); Ácido D-eritro- β -metil aspártico = D-MeAsp (3); Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico = Adda (5); Ácido D-glutâmico (6) ; N-metildihidroalanina = Mdha (7). Em vermelho os L-aminoácidos variáveis, nas posições X (2) e Y (4), respectivamente. Adaptado de: Pereira; Vasconcelos; Antunes (2013).

As microcistinas são denominadas conforme os aminoácidos variáveis (posições “X” e “Y”), sendo que atualmente, mais de 100 tipos variantes de microcistinas já foram identificados (KAASALAINEN et al., 2012; YI et al., 2015). Entre os tipos variantes, a mais comum é a microcistina LR, denominada assim por apresentar os aminoácidos leucina (L) e arginina (R), respectivamente nas posições X e Y (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010; PEREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013). Mas relatos das variantes LA (Leucina:L – Alanina:A), RR (Arginina:R – Arginina:R) e YR (Tirosina:Y – Arginina:R) também são bastantes comuns, além dessas apresentarem efeitos toxicológicos semelhantes a da microcistina LR (PARK et al., 2001).

As microcistinas são sintetizadas pela Microcistina Sintetase que é um sistema misto de enzimas multifuncionais de peptídeo sintetase não ribossomal e policetídeo sintetase (QIAN et al., 2010). A Microcistina Sintetase é codificada em dois operons transcritos em *M. aeruginosa* pelos clusters *mcyA-C* e *mcyD-J* (TILLET et al., 2000). O gene *mcyA* pertence ao cluster *mcyA-C* e codifica a Microcistina Sintetase, já o gene *mcyD* pertence ao cluster *mcyD-J* e codifica o policetídeo sintetase modular que é envolvido na síntese do β -aminoácido Adda, responsável pela toxicidade da microcistina (TILLET et al., 2000). Além disso, a expressão do gene *mcyD* também é essencial para a síntese da microcistina (CHRISTIANSEN et al., 2006). O gene *mcyH* tem sido considerado como um transportador do tipo ABC responsável pelo transporte de microcistina e também relacionado com a via biossintética da microcistina (PEARSON et al., 2004). Dessa forma, o monitoramento desses genes tem sido usado por diversos pesquisadores para avaliar a capacidade de síntese de microcistina (QIAN et al., 2010; FORTIN et al., 2010; YI et al., 2015).

As microcistinas inibem as proteínas serina/treonina fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) em animais e humanos, levando ao excesso de fosforilação de proteínas e alterações no citoesqueleto, à perda da forma das células com destruição subsequente das células do fígado, causando hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010). Elas também são responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo que pode desencadear processos apoptóticos nas células, além de serem consideradas promotoras de tumores (ZHANG et al., 2008; LANKOFF et al., 2008).

Felizmente não existem relatos de mortes humanas ocorridas em decorrência da ingestão de microcistinas, mas sim vários relatos de uma série de efeitos na saúde após a exposição às cianotoxinas quando presentes em água potável ou locais de

recreação por contato dérmico. Por outro lado, na literatura é possível encontrar relatos de intoxicações fatais em animais domésticos e selvagens (GUN et al., 1992; RODGER et al., 1994). Embora nenhuma fatalidade a seres humanos tenha sido registrada devido a ingestão oral da cianotoxina, em fevereiro de 1996, 116 dos 131 pacientes de uma clínica de hemodiálise da cidade de Caruaru/PE, no Brasil relataram distúrbios, náuseas, vômitos e fraqueza muscular após a diálise de rotina. Cem desses afetados desenvolveram insuficiência hepática e 52 acabaram morrendo do que hoje é chamado de Síndrome de Caruaru (AZEVEDO et al., 2002). A causa desta síndrome foi determinada ser cianotoxinas oriundas da água do reservatório que não tinha sido tratada (JOCHIMSEN et al., 1998).

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu um padrão de água potável para as cianobactérias a $1,0\mu\text{g L}^{-1}$ para microcistina LR (WHO, 2011). No Brasil, a Portaria 2.914/2011 que dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade também adota como o valor máximo permitido de microcistina na água $1\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

As microcistinas são altamente solúveis, distribuindo-se facilmente pela água. No entanto, normalmente as microcistinas produzidas pelas células de cianobactérias só são liberadas para o meio, após a morte das mesmas em decorrência do rompimento da parede celular. Essas toxinas são extremamente estáveis e resistem à degradação, como a hidrólise ou a oxidação. Estas toxinas podem quebrar-se lentamente a um temperatura elevada (acima de 40°C) ou pH muito baixo (inferior a 1) ou elevado ($> 9,0$) (HARADA et al., 1996). A meia-vida, ou seja, o tempo que leva para que a metade da toxina possa ser degradada, a $\text{pH}=1,0$ e 40°C é de aproximadamente 3 semanas e, em condições ambientais típicas a meia-vida é de 10 semanas (HARADA et al., 1996).

Assim como já mencionado anteriormente, as cianobactérias estão presentes em muitos copos hídricos em todas as regiões do mundo, em sua maioria em baixas concentrações. No entanto, apenas em condições adequadas, como grandes quantidades de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo e a razão N:P, temperatura acima de 25°C e luminosidade adequada essas cianobactérias se multiplicam rapidamente e formam as florações (COLES; JONES, 2000; BRANDÃO; DOMINGOS, 2006).

Eventos decorrentes do crescimento populacional e da intensificação das atividades agrícolas e industriais têm sido responsáveis pelo lançamento de grandes quantidades de poluentes nos corpos hídricos, principalmente matéria orgânica

e nutrientes, promovendo uma condição de desequilíbrio que acelera o crescimento de algas e de plantas superiores que podem se tornar indesejáveis (VELINI, 2005; CARVALHO et al., 2013). Assim, é evidente que o atual cenário de intensificação do processo de eutrofização observado para a maioria dos corpos hídricos do Brasil e do mundo tem contribuído para que as florações de cianobactérias sejam cada vez mais frequentes (AZEVEDO et al., 2002; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; CARVALHO et al., 2013; LU et al., 2013; LEE et al., 2015; PERSAUD et al., 2015).

Além dos impactos ecológicos e na saúde humana a presença de cianotoxinas podem produzir efeitos econômicos negativos, visto que os custos para o tratamento de água para o abastecimento humano se tornam mais elevados e, no caso de utilização para atividades de contato primário, especialmente para lazer da população, a cor e o odor podem comprometer tal finalidade do corpo hídrico.

Devido aos grandes impactos ambientais, sociais e econômicos que a ocorrência de florações de *M. aeruginosa* pode ocasionar, há crescente demanda em desenvolver estratégias de monitoramento e controle eficazes que ofereçam o menor risco possível ao ambiente e a sociedade (ZHOU et al., 2013).

4.3 Métodos de monitoramento de cianobactérias tóxicas

A formação de florações de cianobactérias e a produção de microcistinas nem sempre apresentam uma correlação muito bem definida, portanto, é extremamente importante o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para o monitoramento de rotina tanto de cianobactérias quanto de microcistinas (YI et al., 2015).

Revisão realizada por Srivastava et al. (2013) apresenta uma ampla discussão sobre as principais formas utilizadas para detectar e monitorar cianobactérias e cianotoxinas em amostras naturais. Em resumo, esses autores subdividem o monitoramento em abordagens biológicas: contagem de células, análises de pigmentos (clorofila α , ficocianinas e sensoriamento remoto) e ferramentas moleculares, (PCR, PCR em tempo real, e ferramentas baseadas em chip); e, as físico-químicas, como os parâmetros de nutrientes e outros (nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, temperatura da água, pH e, testes imunoenzimáticos e métodos cromatográficos (ELISA, PPIA, HPLC, LC-MS etc). As

vantagens e limitações de cada um dos métodos são discutidos, além da importância da integração das diferentes ferramentas para o monitoramento eficiente.

No Brasil, a Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece os planos de amostragem para o controle da qualidade da água para o consumo humano. Devido aos riscos de contaminação da água por cianotoxinas, essa Portaria determina que o monitoramento de cianobactérias deve ter frequência mensal quando a densidade de cianobactérias for menor igual $10.000 \text{ células mL}^{-1}$ ou semanal quando maior que $10.000 \text{ células mL}^{-1}$, sempre buscando identificar os diferentes gêneros presentes no ponto de captação do manancial superficial (BRASIL, 2011). Cabe mencionar que o estabelecimento da frequência do monitoramento considera-se a última amostragem.

Em complementação ao monitoramento é recomendada a análise de clorofila α no manancial, com frequência semanal, como um indicador potencial do aumento da densidade de cianobactérias. Quando a concentração de clorofila α tiver seu valor duplicado ou mais em duas semanas consecutivas, deve-se proceder nova coleta de amostra para a quantificação no ponto de captação do manancial para a reavaliação da frequência da amostragem de cianobactérias (BRASIL, 2011). Conduto, quando a densidade de cianobactérias exceder $20.000 \text{ células mL}$, deve-se realizar análise de cianotoxinas na água do manancial com frequência semanal (BRASIL, 2011).

4.3 Métodos de controle de cianobactérias tóxicas

Muitos métodos têm sido propostos e estudados com a finalidade de inibir florações de cianobactérias. Geralmente, a abordagem mais apropriada é a restrição das descargas de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo em fontes de água (JANCULA; MARSÁLEK, 2011). Entretanto, devido a limitações de ordem econômica, a adoção de medidas que contribuam para minimizar o acúmulo de nutrientes nos corpos hídricos não é aplicada em muitos países. Outro ponto a ser considerado é que essa abordagem apresenta efeito apenas a médio e longo prazo, não garantindo sucesso de controle em curto prazo.

No Brasil, consideráveis avanços estão ocorrendo no Setor de Saneamento Básico, com a finalidade de ampliar o sistema de coleta e tratamento de esgoto nas diversas Unidades da Federação. No entanto, na grande maioria das Estações

de Tratamento, o esgoto coletado é submetido somente ao tratamento primário (sedimentação de partículas em suspensão) e secundário (degradação biológica de compostos carbonáceos – matéria orgânica), permanecendo os efluentes ainda com grandes quantidades de nutrientes.

A importância e a urgente necessidade da acessibilidade de saneamento básico a população é inquestionável, mas a restrição das descargas de nutrientes nos corpos hídricos só é possível após os efluentes serem submetidos ao tratamento terciário. Desse modo, com a aplicação do sistema de tratamento de esgotos (primário e secundário) efluentes com altas concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo, principalmente) continuarão sendo despejados diretamente nos corpos hídricos, podendo então, contribuir para o fenômeno de eutrofização e também para o aumento da frequência de florações de cianobactérias (BRASIL, 2009). Assim, a atual problemática de ocorrência de cianobactérias tóxicas, muito provavelmente no futuro tenderá a ser muito mais relevante do que é hoje.

Desde que os eventos de florações de cianobactérias estão se tornando cada vez mais frequentes, existe uma necessidade de compreender e, eventualmente atenuar os efeitos prejudiciais dessas florações (YI et al., 2015). Assim, medidas complementares às da restrição das descargas de nutrientes tem sido recomendadas, como métodos físicos, biológicos e químicos.

A abordagem física, incluindo a destruição das células com ondas eletromagnéticas (ultrassom), remoção das células presentes na superfície da água, em sedimentos e em outras superfícies costeiras, além do arejamento da coluna de água, manipulação do fluxo do corpo d'água e mistura mecânica (YI et al., 2015) e, a biológica como o aumento da pressão do pastejo “grazing” e concorrência com outros produtores primários pelos recursos do meio (nutrientes) (JANCULA; MARSÁLEK, 2011) têm sido discutidas. Mas, medidas de curto prazo embasadas no uso de compostos químicos ainda são importantes ferramentas que podem ser utilizadas na redução da proliferação de cianobactérias, tanto por meio da inibição do crescimento das espécies de fitoplâncton, como através da diminuição dos nutrientes disponíveis nas fontes de água, principalmente no verão quando as florações são mais frequentes (JANCULA; MARSÁLEK, 2011). No entanto, é importante mencionar que nenhum desses métodos pode remover microcistinas que estão dissolvidas na água (YI et al., 2015).

No Brasil não existe nenhum algicida registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015). No entanto, devido à necessidade de intervenção em alguns casos, mais recentemente, a Resolução CONAMA nº467/2015 estabeleceu os critérios para a autorização de uso de produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais, uma vez que para a utilização de qualquer algicida e/ou método esse necessita de registro para o devido fim (BRASIL, 2015).

Agentes químicos de controle, incluindo metais, antioxidantes, herbicidas e alguns produtos químicos derivados de compostos naturais têm sido relatados como eficientes no controle de cianobactérias (JANCULA; MARSÁLEK, 2011). Contudo, é unânime a ressalva que as medidas químicas devem ser utilizadas como última possibilidade, devido às consequências ecológicas negativas, que incluem a rápida liberação de toxina, a persistência no ambiente, a biocumulação dos agentes de controle e a falta de seletividade (KIM et al., 2007; JANCULA; MARSÁLEK, 2011). Portanto, alguns aspectos precisam ser levados em consideração para o estabelecimento de estratégias de manejo de florações de cianobactérias tóxicas.

Embora existam alguns trabalhos que buscam verificar o efeito de produtos químicos no controle de cianobactérias (MA et al., 2006; 2010; NETHERLAND; LEMBI; POOVEY, 2009), a maioria avaliou somente os padrões de crescimento da cepa de cianobactéria e não verificou a influência dos referidos agentes de controle sobre a produção e acumulação das toxinas. Essa abordagem é muito importante, pois fatores como, temperatura, intensidade de luz, pH, nutrientes, salinidade, radiação ultravioleta, além de traços de metais, podem influenciar o crescimento das espécies de cianobactérias e a produção de cianotoxina (BOOPATHI; KI, 2014; ROSS; SANTIAGO-VÁZQUEZ; PAUL, 2006). Assim, além do controle, é necessário conhecer o efeito do uso dos agentes de controle na síntese de toxina.

Como se sabe a estrutura molecular da microcistina contém alguns aminoácidos, como alanina, leucina, arginina, ácido glutâmico, ácido aspártico, como componentes constitucionais (PEREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013). Em contrapartida, existem alguns herbicidas que apresentam como mecanismos de ação a inibição de aminoácidos em plantas, assim uma questão que ainda pouco compreendida é se herbicidas inibidores da enzima ALS (acetolactato sintase) afeta no desenvolvimento de cianobactérias e/ou na produção de microcistina, uma vez que esses herbicidas podem

reduzir a síntese de leucina, aminoácido constituinte da microcistina LR. Dai et al. (2009) observou a produção de microcistina pode ser afetada pela adição de aminoácidos como fonte de nitrogênio.

Outro aspecto que precisa ser bem definido sobre os produtos químicos são os mecanismos de ação dos agentes utilizados. Por exemplo, os compostos: sulfato de cobre, peróxido de hidrogênio e diuron, interferem na atividade fotossintética de *M. aeruginosa*, podendo levá-la a morte, porém, se usados em altas dosagens, podem romper a célula e liberar as cianotoxinas diretamente na água (ZHOU et al., 2013). O efeito da cloração, procedimento padrão de desinfecção de água destinada ao abastecimento urbano pode danificar as membranas células das cianobactérias, contribuindo para a liberação de substâncias intracelulares, como as toxinas (MA et al., 2012). Assim, a utilização de agentes que promovem lise celular, em condições de altas densidades de cianobactérias, potencializa o risco de contaminação da água. Portanto, reservatórios que contenham cianobactérias oferecem um grande risco à saúde pública, uma vez que, pelo uso de alguns agentes de controle, as toxinas, extremamente solúveis, podem ser liberadas em grandes quantidades na água, e considerando que os métodos de filtragem convencionais não são eficientes em retê-las.

O último aspecto aqui levantado refere-se à especificidade e biodegradabilidade dos agentes de controle. Atualmente compostos químicos mais seletivos e biodegradáveis são preferíveis, por ocasionarem menor impacto ao ambiente, assim, produtos químicos derivados de compostos naturais (aleloquímicos) têm recebido atenção especial em todo mundo. Poucos trabalhos foram realizados buscando identificar e isolar compostos alelopáticos que apresentam propriedades algicidas para o controle de cianobactérias (PARK et al., 2009; ZHANG et al., 2013). O efeito de plantas aquáticas (NAKAI et al., 2000; HONG et al., 2010) e algumas plantas terrestres, como plantas medicinais chinesas (ZHOU et al., 2007; YI et al., 2012) e até arbórea (ROMBOLA, 2014) foram verificados, mas, até o momento, apenas a palha de cevada tem sido utilizada em maior escala em alguns reservatórios da Europa (WAYBRIGHT; TERLIZZI; FERRIER, 2009; UALLACHAIM; FENTON, 2010). Com isso, fica evidente a existência de uma infinidade de espécies vegetais ricas em compostos biativos que ainda não foram investigadas quanto ao seu potencial de controle de cianobactérias.

No Brasil, diversos biomas como Mata Atlântica e o Cerrado, por exemplo, estão bastante devastados, mas ainda possuem enorme variedade de vegetais,

muitos com imenso valor etnofarmacológico e, em apenas em uma parcela irrelevante desses biomas realizou-se algum estudo químico ou farmacológico (REGASINI, 2008). Assim, destaca-se que a exploração racional da flora brasileira, em especial de espécies que acumulam substâncias bioativas já caracterizadas, torna-se importante e estratégico na busca de novas tecnologias e para a preservação dessas áreas.

Mais recentemente, Rombola (2014) estudando o efeito do extrato aquoso de folhas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) no controle do crescimento de *M. aeruginosa* observou inibição de até 90% do crescimento da cianobactéria em meio de cultivo, além da redução da microcistina produzida. O autor conclui que o uso das folhas do guanandi, decompostas em água, pode ser uma alternativa viável de controle preventivo das florações de cianobactérias. Com isso, se desperta o interesse no estudo de outras espécies vegetais brasileiras que possam ser futuramente utilizadas no manejo de florações de cianobactérias.

A manutenção da qualidade da água ofertada a população é um desafio permanente devido a possibilidade de ocorrência de florações de cianobactérias. Assim, a adoção de abordagens fundamentadas em monitoramento e quando necessárias intervenções curativas fazem parte do manejo integrado da qualidade da água dos mananciais, uma vez que nenhuma abordagem sozinha é suficientemente capaz de controlar e/ou evitar as florações (SRIVASTAVA et al., 2013).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos oito estudos com a finalidade de alcançar os objetivos propostos. Todos os ensaios foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia – NuPAM, laboratório associado ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus de Botucatu.

5.1 Cepa e condições de cultivo de *M. aeruginosa*

A cepa axênica de *Microcystis aeruginosa* utilizada nos ensaios foi oriunda da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos/SP). Essa cepa foi mantida em meio de cultivo BG11 composto por NaNO_3 1,5g L⁻¹, K_2HPO_4 0,04g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,036g L⁻¹, Ácido Cítrico 0,006g L⁻¹, Citrato de Amônio Férrico 0,006g L⁻¹, EDTA 0,001g L⁻¹, NaCO_3 0,02g L⁻¹ e 1ml de traços de metais (H_3BO_3 2,86g L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222g L⁻¹, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,39g L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079g L⁻¹, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 49,4mg L⁻¹) e esterilizado (STANIER et al., 1971) sob condições controladas com intensidade luminosa de 140 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (PAR - fluxo de fótons na faixa de 400 a 700nm), fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 28±2°C e agitação uma vez ao dia. A colônia de cianobactérias em fase de crescimento exponencial foi usada tanto na replicação da colônia, quanto na instalação dos ensaios.

5.2 Estudo 1: Triagem do efeito de diferentes substâncias com ou sem ação herbicida conhecida no controle de *M. aeruginosa*

Nesse primeiro estudo 24 substâncias de diferentes mecanismos de ação e/ou grupos químicos foram avaliadas na concentração de 5mg L^{-1} , os detalhes como grupo químico e mecanismo de ação em plantas é apresentado na Tabela 1 (a estrutura química das substâncias encontra-se no Apêndice 1). Uma testemunha sem aplicação de substâncias também foi adicionada para comparação das diferentes respostas. Todas as substâncias utilizadas apresentavam nível de pureza superior a 99%.

Tabela 1. Substâncias avaliadas na concentração de 5mg L^{-1} quanto ao controle de *Microcystis aeruginosa*.

Substâncias	Grupo químico	Mecanismo de Ação em Plantas
Diquat	Bipiridílios	Inibidor do fotossistema 1
Diuron	Uréias substituídas	Inibidor do fotossistema 2
Hexazinone	Triazinonas	Inibidor do fotossistema 2
Atrazine	Triazinas	Inibidor do fotossistema 2
Imazapyr	Imidazolinonas	Inibidor da enzima ALS ¹
Imazapic	Imidazolinonas	Inibidor da enzima ALS
Sulfometuron-methyl	Sulfoniluréias	Inibidor da enzima ALS
Diclosulan	Triazolopirimidinas	Inibidor da enzima ALS
Glyphosate	Derivados de glicina	Inibidor da enzima EPSPS ²
Glufosinate-ammonium	Ácido fosfínico	Inibidor da enzima GS ³
Clomazone	Isoxazolidinona	Inibidor da síntese de carotenoides
Diquetionitrila	isoxazoles	Inibidor da síntese de carotenoides
Sulfentrazone	Triazolinones	Inibidor da enzima PROTOX ⁴
Flumioxazin	Ftalimidas	Inibidor da enzima PROTOX
S-metolachlor	Cloroacetamidas	Inibidor da síntese de lipídeos
2,4-D	Ácido fenoxiacético	Auxina sintética
Sorgoleone	Benzoquinona	-
Resveratrol	Estilbenoide	-
Ácido salicílico	Ácido benzoico	-
Metil salicilato	Ester de ácido benzoico	-
Ácido chiquimico	Ácido benzoico	-
Ácido benzoico	Ácido benzoico	-
Ácido quínico	Ácido benzoico	-
Ácido clorogênico	Ester de ácido benzoico	-

¹ALS= acetolactato sintase (EC 2.2.1.6); ²EPSPS= 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EC 2.5.1.19); ³GS= glutamina sintase (EC 6.3.1.2); ⁴PROTOX= protoporfirinogênio oxidase (EC 1.3.3.4).

A seleção dessas substâncias foi realizada lavando em consideração os seguintes aspectos: a) os herbicidas inibidores do fotossistema 1 e 2, da síntese de carotenoides e da enzima EPSPS são registrados para controle de plantas aquáticas em outros países; b) os herbicidas inibidores da enzima ALS foram incluídos para avaliar a hipótese de que herbicidas com este mecanismo de ação podem alterar a síntese de microcistina LR em função da redução da produção do aminoácido leucina; c) as demais substâncias foram adicionadas por serem herbicidas com características mais vantajosas ao ambiente quando comparados aos algicidas com relatos de uso. A concentração de 5mg L^{-1} é considerada extremamente alta, portanto, qualquer produto que não apresentar efeito nesta dosagem poderá ser excluído dos ensaios subsequentes.

As parcelas experimentais corresponderam a tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultivo BG11 esterilizado que receberam inóculo em quantidades adequadas para que o teor inicial de clorofila α fosse de $0,5\text{mg L}^{-1}$, seguido da adição dos tratamentos e incubadas por 14 dias sob as mesmas condições utilizadas para a manutenção das cepas com agitação para dispersão da colônia, duas vezes ao dia, por aproximadamente 30 segundos (Figura 2). Para maior confiabilidade dos resultados, o ensaio foi conduzido duas vezes, constituindo-se os Ensaios 1a e 1b. Ao término do período de incubação foi quantificado o teor de clorofila α e microcistina LR total conforme descrito nos Itens 5.10 e 5.11, respectivamente.

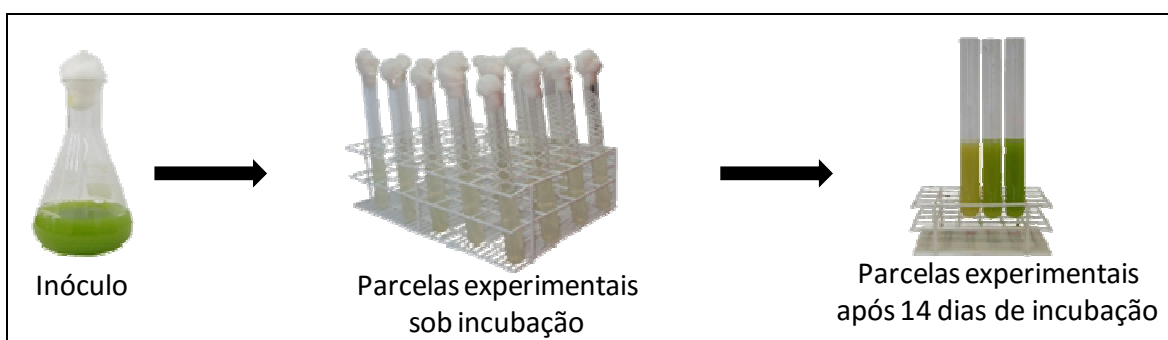


Figura 2. Esquema do inóculo e parcelas experimentais utilizada nos Estudos 1, 2, 3, 4 e 5.

5.3 Estudo 2: Efeito de diferentes concentrações de herbicidas com potencial de controle de *M. aeruginosa*

Nesse estudo, as substâncias: diquat, diuron, glufosinate-ammonium e fluridone foram avaliados nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹, além de uma testemunha sem adição de qualquer substância. A seleção dos tratamentos foi feita após observação dos resultados do Estudo 1 e, as substâncias que mais intensamente reduziram o crescimento de *M. aeruginosa* na concentração de 5mg L⁻¹ foram selecionadas. O fluridone foi incluído apenas nesse estudo e em três concentrações em função da sua indisponibilidade quando o estudo anterior foi realizado. O fluridone é um herbicida de amplo uso em escala mundial no controle de plantas aquáticas submersas e seu mecanismo de ação em plantas está relacionado à inibição da síntese de carotenoides.

As parcelas experimentais e condições de cultivo foi idêntica à utilizada no Estudo 1. O mesmo conjunto de tratamentos foi testado duas vezes, constituindo os Ensaios 2a e 2b.

5.4 Estudo 3: Efeito do sulfato de cobre e hipoclorito de sódio no controle de *M. aeruginosa*

Nesse estudo, dois compostos inorgânicos foram usados: sulfato de cobre [CuSO₄•5H₂O] e o hipoclorito de sódio [NaClO]. O ensaio foi conduzido utilizando concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹ de cada composto, além de uma testemunha sem adição de qualquer produto. As parcelas experimentais e condições de cultivo foram idênticas à utilizada nos Estudos 1 e 2. Esse estudo também foi conduzido duas vezes, constituindo os ensaios 3a e 3b.

5.5 Estudo 4: Eficiência de diferentes concentrações de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de *M. aeruginosa*

Esse estudo foi realizado após os Estudos 1, 2 e 3. Os compostos que apresentaram maior eficiência no controle de *M. aeruginosa* na concentração de 0,2mg

L⁻¹, foram avaliados quanto ao potencial de controle em doses ainda menores. Desse modo, as substâncias diquat, diuron e sulfato de cobre foram avaliadas nas concentrações de 0,2, 0,1, 0,05 e 0,025mg L⁻¹. As parcelas experimentais e as condições de cultivo foram idênticas à utilizada nos estudos anteriores. Esse estudo também foi conduzido duas vezes, constituindo os ensaios 4a e 4b.

5.6 Estudo 5: Efeito de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de *M. aeruginosa* em altas densidades

Para esse estudo foram selecionadas as substâncias e concentrações que apresentaram os maiores níveis de controle de *M. aeruginosa* nos Estudos 1 a 4. Assim, os tratamentos corresponderam às substâncias: diquat, diuron e sulfato de cobre nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹, além de uma testemunha sem aplicação dos agentes de controle.

Os Estudos anteriores foram iniciados com concentração inicial de clorofila α de 0,5mg L⁻¹. Nesse estudo, esse procedimento também foi utilizado, mas as parcelas foram incubadas por 14 dias previamente à aplicação dos agentes de controle em avaliação. Portanto, quando da aplicação dos tratamentos, o teor médio de clorofila α nas parcelas era de 3,342mg L⁻¹ (alta densidade celular de cianobactérias) e, após a aplicação dos agentes de controle a incubação nas mesmas condições foi mantida por mais 7 dias. O tempo estabelecido a posteriori foi necessário para que se alcançasse o nível máximo de controle nos diferentes tratamentos.

Exceto pela aplicação dos compostos após 14 dias de incubação prévia, a metodologia, incluindo a cepa, as condições de cultivo foi idêntica à utilizada nos Estudos 1 a 4. Esse ensaio também foi conduzido duas vezes, constituindo os Ensaios 5a e 5b.

5.7 Estudo 6: Triagem do efeito de biomassa foliar de espécies nativas e adubos verdes no controle de *M. aeruginosa*

No estudo 6 foram investigadas 47 espécies vegetais quanto ao potencial de inibição do crescimento de *M. aeruginosa*. Para isso, as biomassas foliares das

espécies foram subdivididas em dois lotes. O primeiro lote apresentou 23 espécies de árvores nativas (lote 1, Tabela 2) e o segundo foi constituído por 12 espécies de árvores nativas e 12 espécies de adubos verdes (lote 2, Tabela 3), sendo denominados de Ensaios 6a e 6b e, 6c e 6d, respectivamente. As espécies arbóreas nativas foram obtidas no Viveiro de Produção de Mudanças Florestais da FCA/Unesp e apresentavam-se com aproximadamente 30-40cm de altura e com cerca de 5 a 7 folhas completamente expandidas e, as espécies de adubo verde foram cultivadas em vasos em condições de casa de vegetação e coletadas quando apresentavam-se no início do florescimento.

Tabela 2. Detalhes das espécies arbóreas nativas, incluindo espécie, nome comum e família agrupadas no lote 1 que foi investigado quanto ao potencial de controle de *M. aeruginosa*.

Espécie	Nome comum	Família
Testemunha	-	-
<i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.	araticum	Annonaceae
<i>Bixa orellana</i> L.	urucum	Bixaceae
<i>Calophyllum brasiliensis</i> Cambess.	guanandi	Calophyllaceae
<i>Cassia grandis</i> L.f.	acácia	Fabaceae
<i>Citharexylum myrianthum</i> Cham.	pau-viola	Verbenaceae
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	copaíba	Fabaceae
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	capixingui	Euphorbiaceae
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	tamboril	Fabaceae
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	erithina	Fabaceae
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	grumixama	Myrtaceae
<i>Gallesia integrifolia</i> (Spreng.) Harms	pau-d'álho	Phytollacaceae
<i>Guatteria australis</i> A. St.-Hil.	pindaúva-preta	Lauraceae
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. DC.) Mattos	ipê-roxo	Bignoniaceae
<i>Handroanthus ochraceus</i> (Cham.) Mattos	ipê-amarelo	Bignoniaceae
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	jatobá	Fabaceae
<i>Inga</i> sp.	ingá	Fabaceae
<i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms	olho-de-cabra	Fabaceae
<i>Plantonina insignis</i> Mart.	bacuri	Clusiaceae
<i>Pouteria caimito</i> (Ruiz & Pav.) Radlk.	abiu	Sapotaceae
<i>Pterogyne nitens</i> Tul.	amendoim-bravo	Fabaceae
<i>Swartzia langsdorffii</i> Raddi	pocová-de-macaco	Fabaceae
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	mogno	Meliaceae
<i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith	ipê-branco	Bignoniaceae

Tabela 3. Detalhes das espécies arbóreas nativas, incluindo espécie, nome comum e família agrupadas no lote 2 que foi investigado quanto ao potencial de controle de *M. aeruginosa*.

Espécie	Nome comum	Família
Testemunha	-	-
<i>Árvores nativas</i>		
<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip ex Record	guarucaia	Fabaceae
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i> Müll. Arg.	peroba-poca	Apocynaceae
<i>Genipa americana</i> L.	jenipapo	Rubiaceae
<i>Lafoensia glyptocarpa</i> Koehne	mirindiba-rosa	Lythraceae
<i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil.	dedaleira	Lythraceae
<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.	sapucaia	Lecythidaceae
<i>Neomitranthes glomerata</i> (D.Legrand) D.Legrand	araçá	Myrtaceae
<i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan	angico-vermelho	Fabaceae
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F.Macbr.	pau-jacaré	Fabaceae
<i>Psidium guajava</i> L.	goiaba	Myrtaceae
<i>Pterocarpus rohrii</i> Vahl.	aldrago	Fabaceae
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart) Coville	barbatimão	Fabaceae
<i>Adubos verdes</i>		
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp cv. IAC/Fava-larga	guandu (Arbóreo)	Fabaceae
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp cv. IAPAR 43	guandu (Anão)	Fabaceae
<i>Crotalaria breviflora</i> L. cv. Comum	crotalaria-breviflora	Fabaceae
<i>Crotalaria juncea</i> L. cv. IAC-KR1	crotalaria-juncea	Fabaceae
<i>Crotalaria ochroleuca</i> L. cv. Comum	crotalaria-ochroleuca	Fabaceae
<i>Dolichos lablab</i> L. cv. Rongai	lab-lab	Fabaceae
<i>Mucuna aterrima</i> cv. Comum	mucuna-preta	Fabaceae
<i>Mucuna cinereum</i> cv. Comum	mucuna-cinza	Fabaceae
<i>Mucuna deeringiana</i> cv. Comum	mucuna-anã	Fabaceae
<i>Mucuna pruriens</i> (L.) D.C. cv. Comum	mucuna-pruriense	Fabaceae
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> cv. Comum	mucuna-verde	Fabaceae
<i>Neonotomia wightii</i> (J.A. Lackey) cv. Comum	soja-perene	Fabaceae

Para cada material vegetal investigado foram coletadas folhas desenvolvidas e sadias de cerca de cinco plantas (primeira e/ou segunda folha completamente expandida), obtendo-se uma amostra composta. As folhas foram congeladas e posteriormente liofilizadas por 48 horas (Alpha 1-2/LD plus; Martin Christ), após, reduzidas a pó através de maceração manual em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até a instalação dos ensaios (Figura 3).

Para esse estudo optou-se em utilizar uma quantidade de material vegetal macerado (biomassa foliar) equivalente a 1.000 kg ha⁻¹ de água (100mg L⁻¹), considerando 10.000m² x 1m de profundidade. A utilização de palha de cevada é

considerada uma das poucas alternativas de controle de florações de cianobactérias utilizando-se material vegetal e, conforme revisão realizada por Xiao et al. (2010) considerando dados de lagoas, reservatórios e laboratórios as quantidades de palha de cevada eficazes na inibição de cianobactérias variam entre 100 a 7200mg (peso seco) L⁻¹.

As parcelas experimentais corresponderam a frascos de vidro (com diâmetro de 30mm, tipo penicilina) de 35mL, contendo 10mL de meio de cultivo BG11 esterilizados que receberam o inóculo em quantidades adequadas para que o teor inicial de clorofila α fosse de 0,5mg L⁻¹. Após a adição da biomassa foliar, as parcelas experimentais foram incubadas por 5 dias sob as mesmas condições descritas anteriormente para a manutenção das cepas e agitadas por 3 minutos a cada 3 horas (Figura 4).



Figura 3. Representação da posição das folhas coletadas e do procedimento realizado para obtenção da biomassa macerada.

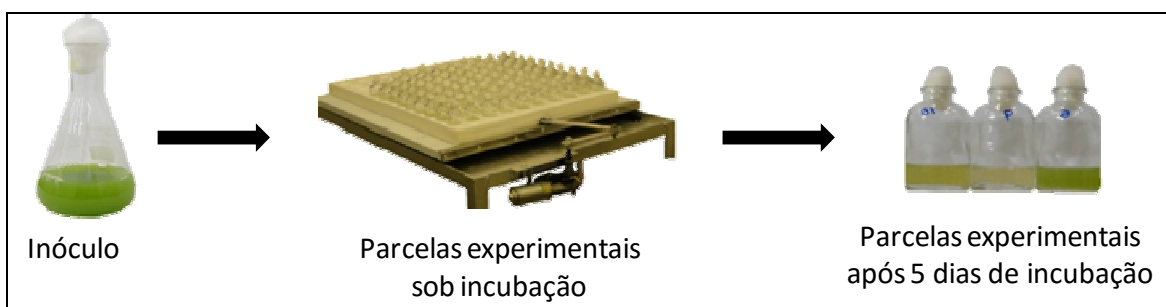


Figura 4. Esquema do inóculo e parcelas experimentais utilizada nos Estudos 6, 7 e 8.

5.7 Estudo 7: Curva dose-resposta de biomassa foliar das espécies mais promissoras

A biomassa das espécies *Guatteria australis*, *Pterogyne nitens*, *Handroanthus ochroceus* e *Copaifera langsdorffii* foram selecionadas por apresentarem maiores reduções nos teores de clorofila α nos ensaios de triagem inicial (Estudo 6). As concentrações de 0, 10, 25, 50 e 100mg L⁻¹ de biomassa foliar de cada uma das espécies indicadas foram testadas nesse estudo. Devido ao pequeno volume de biomassa necessário para alcançar as concentrações avaliadas, especialmente as menores, a biomassa foi misturada e macerada com areia lavada e esterilizada na proporção de 1:19 (biomassa: areia), e a mistura resultante foi utilizada nos ensaios. A adição da areia na maior proporção não afetou o crescimento da cianobactéria. Um tratamento testemunha auxiliar com areia foi adicionada em ambos os estudos.

As parcelas experimentais e condições de cultivo foram idênticas a utilizada no Estudo 6, sendo o ensaio também conduzido duas vezes, constituindo-se os Ensaio 7a e 7b.

5.9 Estudo 8: Variabilidade do efeito da biomassa foliar de plantas individuais de *Guatteria australis* e *Pterogyne nitens* no controle de *M. aeruginosa*

Nesse ensaio, a biomassa foliar de plantas individuais de *Guatteria australis* e *Pterogyne nitens* foram avaliadas. A coleta das folhas foram realizadas isoladamente para cada planta de forma similar a descrita no Estudo 6. Após a obtenção as biomassas, as mesmas foram misturadas e maceradas com areia na proporção de 1:19 (biomassa:areia) conforme realizado no Estudo 7. Para esse estudo, foram utilizadas 10 plantas de *G. australis*, constituindo-se os ensaios 8a e 8b e, 14 plantas de *P. nitens*, constituindo-se os ensaios 8c e 8d. As biomassas foram testadas na concentração de 35mg L⁻¹, quantidade necessária para reduzir aproximadamente 50% do teor de clorofila α (DR₅₀) determinada no Estudo 7.

As parcelas experimentais e condições de cultivo foi idêntica a utilizada no Estudo 6 e 7. Como apresentado, cada ensaio foi conduzido duas vezes.

5.10 Determinação do teor de clorofila α

O teor de clorofila α foi determinado por meio de dois procedimentos. Nos Estudos 1, 2, 3 e 4, alíquotas de 1mL do meio de cultivo de cada parcela experimental foram analisadas por espectrofotometria, sem qualquer processamento, constituindo a quantificação de forma direta, conforme representado na Figura 5-A. No entanto, a leitura direta das absorbâncias envolvidas na determinação do teor de clorofila α foram inviabilizadas no Estudo 5, porque as parcelas em que houve controle expressivo o meio de cultivo tornou-se turbido e, nos Estudos 6, 7 e 8 devido a presença de fragmentos suspensos na solução. Assim, para esses estudos optou-se em realizar a filtração de alíquotas em filtros de membrana PVDF (Millex[®]HV, Millipore Co., Irlanda) com poros de 0,45 μ m, diâmetro suficiente para reter as células das cianobactérias. Desse modo, após a filtração de 1mL de amostra as membranas foram lavadas com 2mL de metanol e uma alíquota de 1mL do volume total resultante foi utilizado para quantificar a clorofila α nos Estudos 5, 6, 7 e 8, conforme representado na Figura 5-B.

Todas as leituras de absorbância foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível do tipo duplo feixe e com dois monocromadores (Cintra 40, GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrália) nos comprimentos de onda 663 e 750nm em cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Em ambos os comprimentos de onda, a fenda de passagem foi de 5nm. A quantificação da clorofila α em mg L⁻¹ foi realizada segundo os procedimentos descritos por Lee et al. (1994) utilizando a expressão:

$$\text{Concentração de clorofila } \alpha = 12,2 \times (\text{Absorbância em 663nm} - \text{Absorbância em 750nm})$$

Considerando a somatória de análises de clorofila de todos os ensaios conduzidos, foram realizadas 1.304 análises.

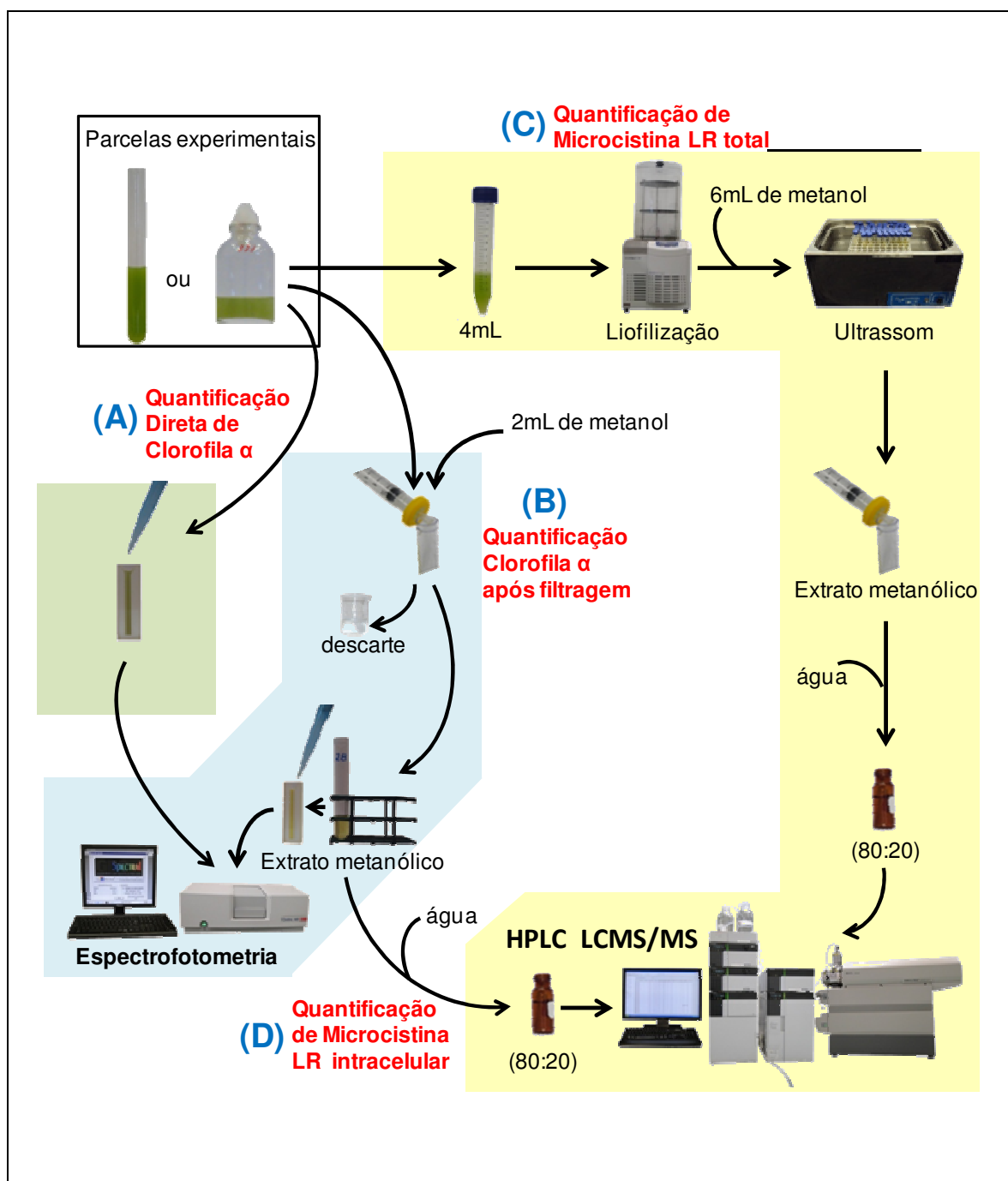


Figura 5. Esquema dos procedimentos utilizados para quantificação dos teores de clorofila α e de microcistina LR. A) Quantificação direta dos teores de clorofila α ; B) Quantificação dos teores de clorofila α após a filtragem em filtros de membrana PVDF com poros de 0,45 μ m; C) Quantificação de microcistina LR total; e, D) Quantificação dos teores de microcistina LR intracelular apartir do extrato metanólico oriundo do procedimento B.

5.11 Determinação do teor de microcistina LR

Os teores de microcistinas LR total, intracelular e extracelular foram obtidos por diferentes procedimentos. Para a quantificação de microcistina LR total, 4mL de cada unidade experimental foram liofilizadas até secagem total e suspensos em 6mL de metanol. Após três ciclos de sonicação de três minutos os extratos foram filtrados em filtros de membrana PVDF com poros de 0,45 μ m. Uma alíquota de 0,8mL dos extratos filtrados foi transferida para vials de cromatografia e acrescida de 0,2mL de água ultrapura (Figura 5-C). A determinação da concentração de microcistina foi feita através de cromatografia de alta performance (HPLC) combinada com espectrômetro de massa com detector do tipo quadrupolo no modo de ionização eletrostática positiva (HPLC LC/MS/MS 3200 QTrap (AB Scieco Pte. Ltd., USA).

Foi empregado uma coluna Synergi 2,55 μ m Hydro-RP 100A (50x4,6mm x 2,5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) e a separação cromatográfica foi realizada usando um gradiente de eluição combinando a fase móvel A (0,1% de ácido acético em água) e a fase móvel B (0,1% de ácido acético em metanol) em fluxo de 0,5mL min⁻¹ como segue: iniciou-se com 30% da fase B, progredindo em 1 minuto para 95% da fase B aos 5 minutos; a participação de 95% da fase B foi mantida até 7 minutos; entre 7 e 9 minutos a porcentagem da fase B foi reduzida para o valor inicial de 30% que permaneceu até 11 minutos quando a análise é encerrada. A toxina foi detectada e quantificada utilizando procedimentos específicos de varredura MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) em concentrações iguais ou superiores a 1,5ng mL⁻¹ (limite de quantificação). O tempo de retenção da microcistina LR foi de 5,52 minutos e as massas selecionadas foram: Q1=995,386 e Q3= 135,3; 107; 127,2; 70,2 e; 86. O fragmento utilizado para quantificação da molécula foi o de massa igual 135,3, ou seja, o de maior intensidade (Figura 6). A curva de calibração foi linear dentro do intervalo de 7,8125 a 500ng mL⁻¹, sendo representada pela equação $y=$ e alto coeficiente de correlação ($R^2 \geq 0,9999$).

No Estudo 5 além do teor de microcistina LR total, o teor de microcistina LR intracelular foi determinada. Para isso, os mesmos extratos utilizados na quantificação de clorofila α (procedimento com filtragem) foram também utilizados para determinar os teores de microcistina LR. Nesse caso, os teores encontrados correspondem aos teores internos às células que foram retidas pelo filtro de membrana e posteriormente

extraídas pelo metanol. Os teores externos às células (extracelular) corresponderam aos valores da diferença entre os teores totais e internos.

Conjuntamente a quantificação de microcistina LR, as variantes YR, LA e RR também foram determinadas, no entanto não foram encontrados valores expressivos, caracterizando que a linhagem da cepa utilizada nesse trabalho é tipicamente produtora de microcistina LR.

Considerando a somatória de análises de microcistina LR total e intracelular de todos os ensaios conduzidos, foram realizadas 1.016 análises.

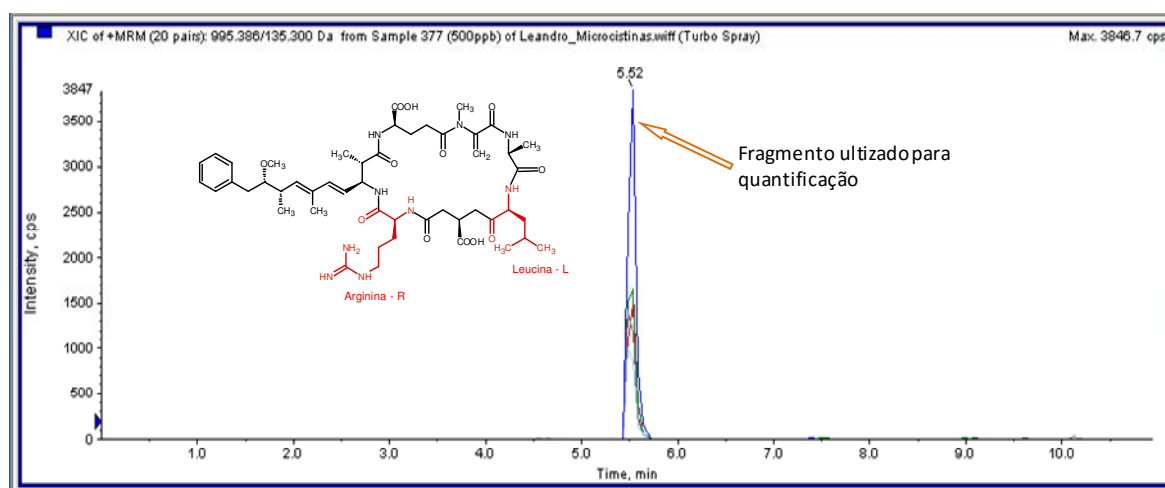


Figura 6. Exemplo de cromatograma dos fragmentos de massas selecionados em Q3 da microcistina LR. Intensidade do fragmento 135,3 com o tempo de retenção na coluna cromatográfica de 5,52 minutos.

5.12 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variâncias. Para comparar as médias, optou-se pelo uso do teste T ao nível de 5% de probabilidade. Todos os ensaios foram conduzidos com quatro repetições e em delineamento inteiramente casualizado. Embora todos os ensaios tenham sido conduzidos duas vezes, foram conduzidos e analisados em separado.

Para simplificar a obtenção de conclusões, os teores médios de clorofila α ou de microcistina LR total dos Estudos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram transformados em porcentagem dos valores médios encontrados no tratamento testemunha para cada um dos ensaios e posteriormente determinou-se a média considerando os dois ensaios conduzidos. Na sequência a relação entre as médias assim obtidas para os teores de clorofila α e microcistina LR foram representadas com a adição de uma linha de equivalência.

Os dados referentes aos teores de clorofila α oriundos do Estudo 7 também foram ajustados ao modelo de regressão não linear logístico, proposto por Streibig (1988). No entanto, quando o modelo proposto não se ajustou adequadamente os dados, foram apenas representados por meio de média e desvio padrão.

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c}$$

Sendo: y= teor de clorofila em % da testemunha; x= dosagem da biomassa foliar; a, b e c= parâmetros estimados da equação, de tal forma que: a= amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável; b= dosagem que proporciona redução de 50% do teor de clorofila; c= declividade da curva ao redor de b.

A eficiência relativa das substâncias e/ou biomassas no crescimento de *M. aeruginosa* e na produção de toxina foi estimada pela equação descrita a seguir:

$$ERT(\%) = \left(1 - \frac{N}{N_o}\right) \times 100$$

Sendo: ERT (%) = Eficiência Relativa do Tratamento; N e N_o , correspondem ao teor médio de clorofila α ou de microcistina LR dos tratamentos e da testemunha, respectivamente. O teor médio foi calculado considerando a média do tratamento dos ensaios conduzidos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a análise, as informações obtidas nos diferentes estudos são apresentadas em subitens específicos.

6.1 Estudo 1: Triagem do efeito de diferentes substâncias com ou sem ação herbicida conhecida no controle de *M. aeruginosa*

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentadas as informações referentes aos teores de clorofila α e microcistina LR total observada no Ensaio 1a e em sua duplicata 1b, respectivamente. Na Figura 7 a relação entre as médias obtidas para os teores de clorofila α e microcistina LR total é representada graficamente. O primeiro aspecto a ser destacado refere-se aos baixos coeficientes de variação, sobretudo na análise dos teores de clorofila α , indicando elevada precisão dos métodos experimentais utilizados.

Alterações nos teores de clorofila α de cianobactérias têm sido amplamente utilizadas como indicativo do efeito toxicológico de diversas substâncias, por correlacionar-se com a biomassa de fitoplânctons (SHAO et al., 2015; MA et al., 2010; ALUM et al., 2008). Assim, as substâncias que promoveram maiores reduções do teor de clorofila α foram consideradas como mais eficientes no controle de *M. aeruginosa*.

Das substâncias testadas, as que promoveram maiores reduções do teor de clorofila α foram diquat, diuron, glufosinate-ammonium, hexazinone e atrazine. Os teores médios de clorofila α observados para esses herbicidas foram de 6,09%, 21,52%, 27,79%, 30,00% e 30,32% em relação à testemunha, respectivamente.

Tabela 4. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observado no Ensaio 1a e em sua duplicata 1b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha. As substâncias foram testadas na concentração de 5mg L^{-1} .

Substância	Ensaio 1a		Ensaio 1b	
	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	2,054	100,00	1,996	100,00
Diquat	0,081	3,96	0,164	8,21
Diuron	0,423	20,59	0,448	22,46
Hexazinone	0,610	29,71	0,605	30,28
Atrazine	0,578	28,13	0,649	32,51
Imazapyr	1,952	95,02	2,026	101,48
Imazapic	1,956	95,25	1,884	94,37
Sulfometuron-methyl	1,939	94,42	1,902	95,25
Dichlosulan	1,967	95,78	1,976	98,99
Glyphosate	1,878	91,41	2,058	103,09
Glufosinate-ammonium	0,542	26,36	0,583	29,19
Clomazone	2,157	105,04	2,216	111,00
Diquetonitrila	2,111	102,78	2,222	111,30
Sulfentrazone	2,142	104,30	2,212	110,79
Flumioxazin	2,209	107,57	2,356	118,03
S-Metolachlor	2,187	106,50	2,162	108,30
2,4-D	1,647	80,18	1,577	78,97
Sorgoleone	1,819	88,56	1,832	91,78
Resveratrol	2,287	111,33	2,154	107,89
Ácido Salicílico	2,384	116,09	2,208	110,58
Metil salicilato	2,193	106,79	2,178	109,10
Ácido Shiquimico	2,239	109,02	2,281	114,24
Ácido Benzoico	2,320	112,96	2,353	117,86
Ácido Quínico	2,193	106,77	2,207	110,53
Ácido Clorogênico	2,187	106,50	2,149	107,62
F tratamentos	237,15		169,81	
C.V. (%)	5,14		5,90	
D.M.S. - Teste T a 5%	0,090	4,3894	0,104	5,23086
I.C. Teste T a 5% - Limite superior	2,144	104,389	2,101	105,231
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior	2,225	108,350	1,892	94,769

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;24;75)}=1,66$; $F_{\text{tab.}(0,01;24;75)}= 2,04$.

Tabela 5. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observado no Ensaio 1a e em sua duplicata 1b, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ e em porcentagem da média da testemunha. As substâncias foram testadas na concentração de 5 mg L^{-1} .

Substância	Ensaio 1a		Ensaio 1b	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha
Testemunha	505,86	100,00	425,78	100,00
Diquat	86,99	17,20	82,30	19,33
Diuron	88,79	17,55	112,85	26,50
Hexazinone	121,41	24,00	112,81	26,50
Atrazine	105,86	20,93	121,88	28,62
Imazapyr	427,73	84,56	421,09	98,90
Imazapic	415,23	82,08	423,44	99,45
Sulfometuron-methyl	383,98	75,91	388,67	91,28
Dichlosulan	429,69	84,94	400,00	93,94
Glyphosate	475,78	94,05	406,64	95,50
Glufosinate-ammonium	130,39	25,78	134,88	31,68
Clomazone	510,16	100,85	541,80	127,25
Diquetonitrila	497,66	98,38	485,94	114,13
Sulfentrazone	538,67	106,49	512,89	120,46
Flumioxazin	511,33	101,08	489,45	114,95
S-Metolachlor	462,11	91,35	526,17	123,58
2,4-D	758,59	149,96	677,93	159,22
Sorgoleone	355,47	70,27	381,25	89,54
Resveratrol	351,56	69,50	405,47	95,23
Ácido Salicílico	388,28	76,76	402,34	94,50
Metil salicilato	432,81	85,56	405,08	95,14
Ácido Shiquimico	426,56	84,32	392,19	92,11
Ácido Benzoico	374,61	74,05	410,16	96,33
Ácido Quínico	356,25	70,42	391,41	91,93
Ácido Clorogênico	379,30	74,98	371,09	87,16
F tratamentos		62,64		70,23
C.V.(%)		10,81		9,54
D.M.S. - Teste T a 5%	40,98	8,10	35,82	8,41
I.C. Teste T a 5% - Limite superior	546,84	108,10	461,60	108,41
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior	464,88	91,90	389,96	91,59

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5%= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;24;75)}=1,66$; $F_{\text{tab.}(0,01;24;75)}= 2,04$.

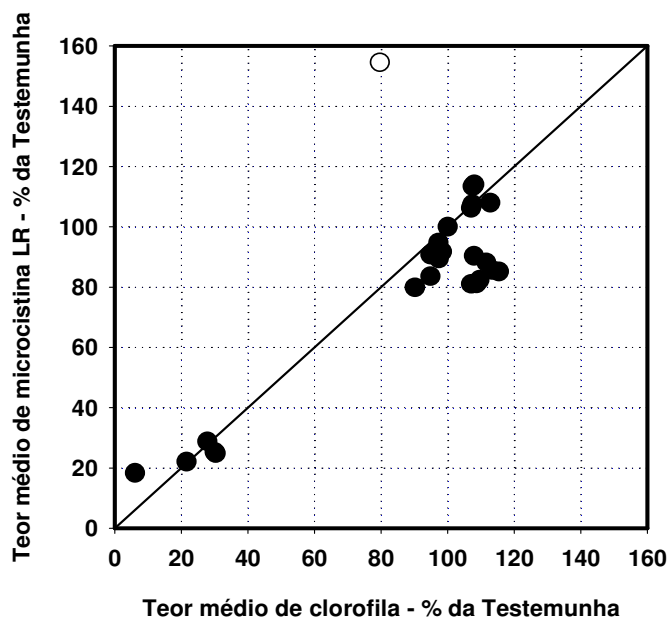


Figura 7. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha. (○) corresponde ao tratamento 2,4-D; (●) corresponde aos demais tratamentos. Concentração das substâncias de 5mg L^{-1} .

Os demais tratamentos não afetaram o teor de clorofila α , ou seja, apresentaram teores médios de clorofila próximos ao teor da testemunha (100% na escala relativa), indicando que, se houve redução de crescimento da cianobactéria, esse efeito foi pouco intenso, mesmo com o uso de concentração bastante alta dos compostos (5mg L^{-1}).

Os herbicidas inibidores da enzima ALS testados (imazapyr, imazapic, sulfometuron-methyl e dichlosulan) não proporcionaram alterações consideráveis no desenvolvimento de *M. aeruginosa* e nem na produção de microcistina LR.

Quando se analisou os teores de microcistina LR total, as conclusões são similares. As menores concentrações de microcistina LR foram de 18,26%, 22,03%, 24,78%, 25,25% e 28,73%, respectivamente para diquat, diuron, atrazine, hexazinone e glufosinate-ammonium. Efetivamente, a análise da Figura 7 evidencia que os teores de clorofila α e microcistina LR são proporcionais para a maioria dos tratamentos, exceto para o 2,4-D (representado como um círculo não preenchido). Nesse tratamento, o

teor médio de clorofila foi 79,57%, mas o teor médio de microcistina alcançou o valor de 154,59% do valor médio encontrado nas testemunhas.

Na Figura 8 os dados são expressos em eficiência relativa dos tratamentos para os teores de clorofila α e microcistina LR total. Assim, observou-se maiores eficiências para os tratamentos diquat, diuron, hexazinone, atrazine e glufosinate-ammonium no controle de *M. aeruginosa* quando utilizados na concentração de 5mg L⁻¹. No entanto, para o tratamento 2,4-D, que é um herbicida que atua como regulador de crescimento em plantas obteve uma eficiência relativa no controle de *M. aeruginosa* de 20,43%, ao passo que o teor de microcistina LR foi estimulado em 54,59%. Ha; Hidaka; Tsuno (2011) destacam que a concentração de microcistina depende do número de células de cianobactérias (densidade) e/ou da capacidade dessas células em sintetizar microcistinas.

O efeito de algumas substâncias sobre a regulação da transcrição dos cluster de genes relacionados com a síntese de microcistina já foram estudas por alguns autores. Qian et al. (2010) observaram que o peróxido de hidrogênio (50 μ M) e sulfato de cobre (0,5 μ M) afetou negativamente a transcrição do gene *mcyD*, gene responsável pela síntese de β -aminoácido Adda, além de ser essencial para a síntese de microcistina, indicando a diminuição do nível de microcistina nas células de *M. aeruginosa*. O antibiótico ampicilina, o herbicida atrazine e metal pesado cádmio também foram responsáveis por diminuir a transcrição do gene *mcyD* e do teor de microcistina das células (QIAN et al 2012). Por outro lado, Ceballos-Laita et al. (2015) observaram que o organoclorado γ -lindane, importante poluente dos ecossistemas aquáticos foi capaz de induzir a expressão do gene *mcyD*, aumento a síntese de microcistina em *M. aeruginosa*. No entanto, poucos estudos focaram na avaliação dos efeitos que as diferentes substâncias possam ocasionar na síntese de microcistina.

Nesse estudo, os compostos mais eficazes no controle de *M. aeruginosa* na concentração de 5mg L⁻¹ foram os herbicidas diquat, diuron, glufosinate-ammonium, hexazinone e atrazine. Também ficou evidente que esses tratamentos foram eficazes em inibir a proliferação da cianobactéria e muito possivelmente não afetaram a síntese de microcistina, exceto o 2,4-D que precisa de estudos adicionais para confirmação da resposta e/ou compreensão do fenômeno. Dentre eles, o diquat foi mais efetivo em reduzir o crescimento de *M. aeruginosa* e a acumulação de microcistina LR total.

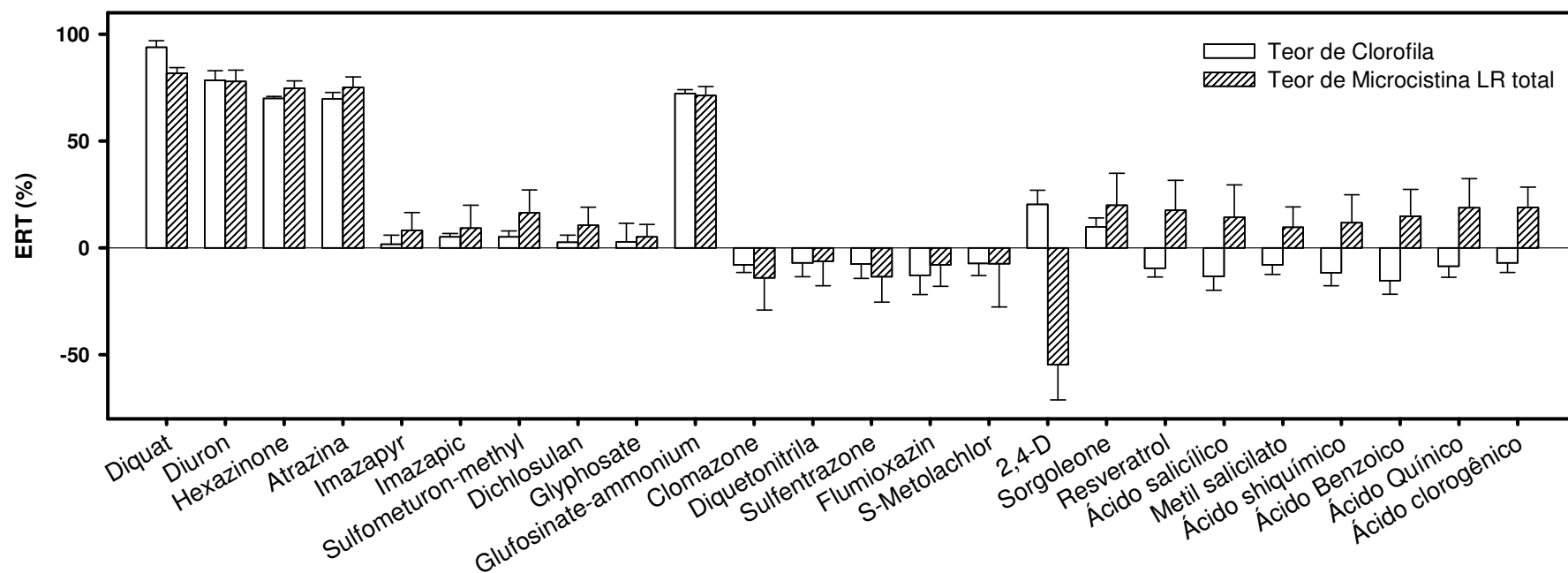


Figura 8. Eficiência Relativa dos diferentes Tratamentos (ERT - %) sobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total na concentração de 5 mg L^{-1} . Os dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6.2 Estudo 2: Efeito de diferentes concentrações de herbicidas com potencial de controle de *M. aeruginosa*

As informações referentes aos teores de clorofila α e microcistina LR total observadas no Ensaio 2a e em sua duplicata 2b são apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Na Figura 9 a relação entre as médias dos teores de clorofila α e microcistina LR total é representada, ao passo que na Figura 10 consta a eficiência relativa dos tratamentos, tanto para os teores de clorofila α , como para os de microcistina LR total.

Nesse estudo, os herbicidas diquat, diuron e glufosinate-ammonium, que já haviam demonstrado potencial de controle de *M. aeruginosa* no estudo anterior, foram testados nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹. Dentre os três, o diquat foi o que se mostrou mais efetivo em termos de redução dos teores de clorofila α . Os valores dos teores de clorofila α em relação à testemunha para o diquat foram de 8,75%, 9,92% e 19,51%, respectivamente para as dosagens de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹. O segundo herbicida que mais afetou o teor de clorofila foi o diuron, apresentando 19,11% (5mg L⁻¹), 25,35% (1mg L⁻¹) e 32,22% (0,2mg L⁻¹). Os teores de microcistina também foram reduzidos de forma proporcional aos teores de clorofila, porém de forma menos intensa (Figura 9).

O glufosinate-ammonium demonstrou efeito apenas quando utilizado na maior concentração (5mg L⁻¹), com redução do teor médio de clorofila α de 50,06%. No entanto, esse inibidor da síntese de glutamina (GS) não reduziu os teores de microcistina LR. Faber et al. (1998) observaram efeito similar na mesma faixa de concentração, ou seja, o glufosinate-ammonium promoveu redução das células vivas de fitoplâncton na dosagem de 10mg L⁻¹, mas não induziu qualquer alteração a 1mg L⁻¹.

Os resultados indicam que o fluridone reduziu os teores de clorofila α , mas de modo menos intenso do que o diquat e o diuron. Contudo, esse herbicida praticamente não reduziu os teores de microcistina LR, mesmo em sua maior concentração. Na concentração de 0,2mg L⁻¹ houve expressivo aumento no teor da toxina. O fluridone é um importante herbicida aquático utilizado para controlar plantas submersas e emergentes vasculares com registro em alguns países, como Estados Unidos e Canadá. Na literatura é descrito que a produção de cianotoxinas pode ser afetada pela temperatura, intensidade luminosa, nutrientes, traços de metais, dentre outros fatores. Assim, Considerando que o tratamento fluridone (0,2mg L⁻¹) estimulou a produção de microcistina LR em cerca de 80%, esse evento precisa de estudos adicionais, uma vez que esse herbicida é amplamente

utilizado em corpos hídricos em outros países e se confirmado essa resposta o uso de fluridone poderá agravar o problema de ocorrência de cianobactérias tóxicas em corpos hídricos após sua aplicação.

A análise da Figura 9 evidencia que o único ponto sobre a linha de equivalência (linha na transversal) é o que têm coordenadas (100; 100), correspondendo exatamente ao tratamento testemunha sem aplicação dos agentes de controle em teste. Todos os demais pontos estão acima da linha de equivalência indicando que os compostos em teste ou estimularam a produção da toxina ou reduziram de modo mais intenso os teores de clorofila α do que o fizeram com os teores microcistina LR.

Tabela 6. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 2a e em sua duplicata 2b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Herbicida ou composto	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 2a		Ensaio 2b	
		mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	-	2,13	100,00	2,03	100,00
Diquat	5	0,18	8,64	0,18	8,87
Diquat	1	0,20	9,59	0,20	10,26
Diquat	0,2	0,40	19,08	0,40	19,94
Diuron	5	0,41	19,34	0,38	18,88
Diuron	1	0,51	23,89	0,54	26,82
Diuron	0,2	0,66	30,93	0,68	33,50
Fluridone	5	0,88	41,66	0,80	39,76
Fluridone	1	1,27	59,97	1,00	49,41
Fluridone	0,2	1,99	93,46	1,70	84,12
Glufosinate-ammonium	5	1,15	53,89	0,93	46,24
Glufosinate-ammonium	1	1,81	84,84	1,49	73,71
Glufosinate-ammonium	0,2	1,88	88,55	1,89	93,19
F tratamentos		81,64		123,57	
C.V. (%)		15,25		22,19	
D.M.S. - Teste T a 5%		0,16	7,51	0,16	8,04
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		2,29	107,51	2,19	108,04
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		1,97	92,49	1,87	91,96

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S.- Teste T a 5%= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;12;39)}=2,01$; $F_{\text{tab.}(0,01;12;39)}= 2,67$.

Tabela 7. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 2a e em sua duplicata 2b, expressos em mg L⁻¹ e em porcentagem da média da testemunha.

Substâncias	Concentração (mg L ⁻¹)	Ensaio 2a		Ensaio 2b	
		µg L ⁻¹	% da Testemunha	µg L ⁻¹	% da Testemunha
Testemunha	-	331,25	100,00	323,05	100,00
Diquat	5	110,74	33,43	111,52	34,52
Diquat	1	115,70	34,93	102,93	31,86
Diquat	0,2	150,12	45,32	136,84	42,36
Diuron	5	131,02	39,55	123,48	38,22
Diuron	1	109,26	32,98	129,18	39,99
Diuron	0,2	125,78	37,97	117,97	36,52
Fluridone	5	305,47	92,22	245,39	75,96
Fluridone	1	378,13	114,15	339,06	104,96
Fluridone	0,2	633,20	191,16	572,27	177,15
Glufosinate-ammonium	5	290,90	87,82	237,07	73,39
Glufosinate-ammonium	1	364,84	110,14	301,56	93,35
Glufosinate-ammonium	0,2	373,05	112,62	369,92	114,51
F tratamentos		65,44		28,49	
C.V. (%)		14,80		21,89	
D.M.S - Teste T a 5%		39,37	11,88	52,97	16,39
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		370,62	111,88	376,02	116,39
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		291,88	88,12	270,08	83,61

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;12;39)}=2,01$; $F_{\text{tab.}(0,01;12;39)}= 2,67$.

As microcistinas são muito estáveis em sistemas aquáticos por possuírem estrutura cíclica e, a maioria dos tratamentos mesmo sendo eficientes em controlar as cianobactérias não são eficazes em degradá-las ou apresentam baixa eficiência (SUI et al., 2014). Portanto, os tratamentos de água potável convencionais também apresentam eficácia limitada na remoção de microcistinas dissolvidas tornando a sua presença extremamente preocupante sob o ponto de vista de saúde pública (KULL et al., 2004).

Nesse estudo pôde-se concluir que os herbicidas diquat e diuron foram os mais efetivos em reduzir o crescimento de *M. aeruginosa* e a acumulação de microcistina LR, mesmo na menor concentração (0,2mg L⁻¹) esses herbicidas foram efetivos. Enquanto que os herbicidas fluridone e amônio glufosinate foram efetivos em reduzir os teores de clorofila α e microcistina LR somente na maior concentração (5mg L⁻¹).

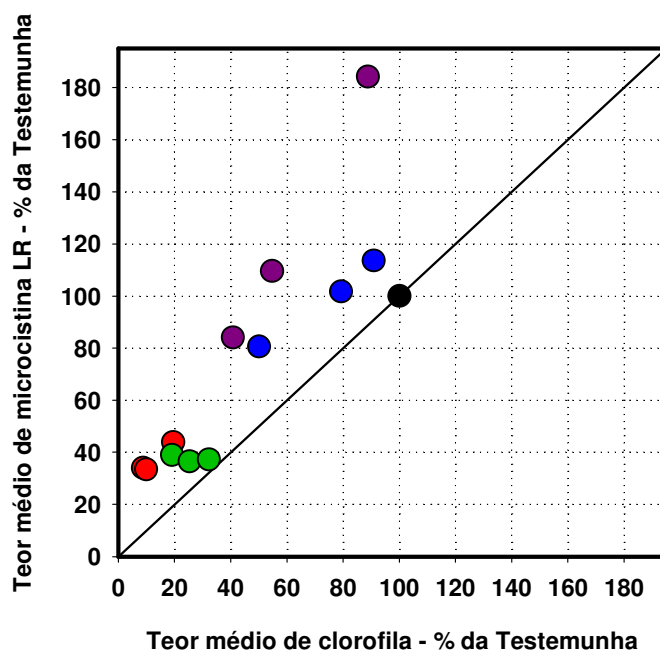


Figura 9. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha. (●), (●), (●), (●) e (●) correspondem respectivamente aos tratamentos: testemunha, diquat, diuron, fluridone e glufosinate-ammonium.

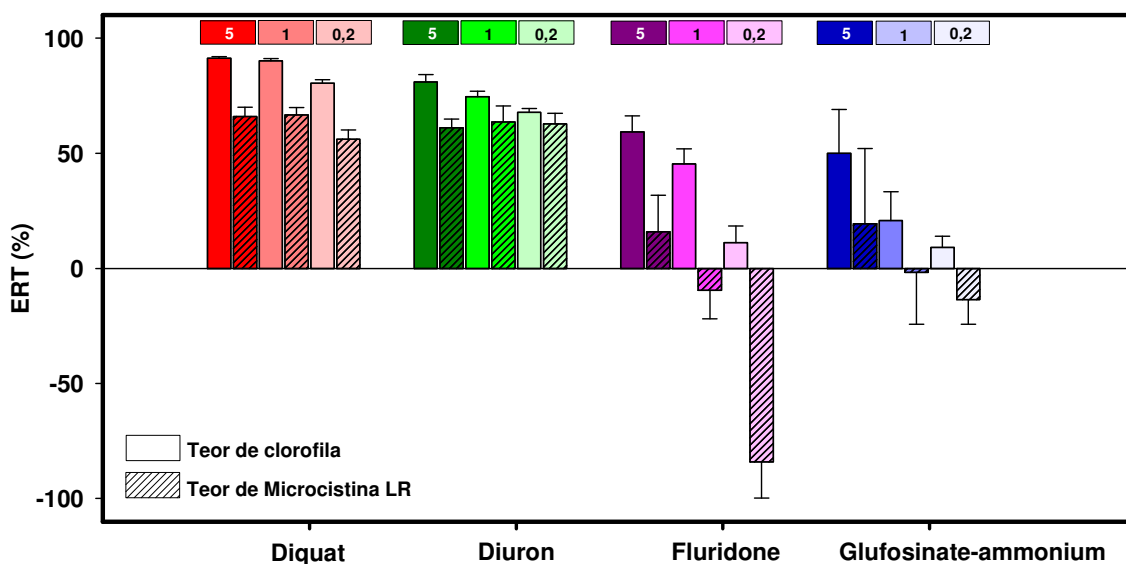


Figura 10. Eficiência relativa dos tratamentos (ERT - %): diquat, diuron, fluridone e glufosinate-ammonium aobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6.3 Estudo 3: Efeito do sulfato de cobre e hipoclorito de sódio no controle de *M. aeruginosa*

De modo similar aos estudos anteriores, nas Tabelas 8 e 9 estão apresentadas as informações referentes aos teores de clorofila α e microcistina LR observados nos ensaios 3a e 3b, respectivamente. Na Figura 11 é representada a relação entre as médias dos teores de clorofila α e microcistina LR total e, na Figura 12 a eficiência relativa dos tratamentos.

Dentre os dois compostos inorgânicos avaliados, apenas o sulfato de cobre demonstrou potencial de controle de *M. aeruginosa*, reduzindo tanto o teor de clorofila α , quanto o teor de microcistina LR nas três concentrações testadas. Os efeitos mais intensos foram observados nas duas maiores doses, destacando-se a dose de 1 mg L^{-1} , como a mais eficaz. O sulfato de cobre pode impedir o crescimento de cianobactérias, pois pode apresentar efeito algicida e/ou algistático conforme relatos de estudos anteriores (PADOVESI-FONSECA; PHILOMENO, 2004; HOBSON et al., 2012; FAN et al., 2013).

Tabela 8. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 3a e em sua duplicata 3b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Herbicida ou composto	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 3a		Ensaio 3b	
		mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	-	3,27	100,00	3,41	100,00
Sulfato de cobre	5	0,29	8,62	0,28	8,29
Sulfato de cobre	1	0,25	7,71	0,25	7,53
Sulfato de cobre	0,2	0,31	16,94	0,81	23,90
Hipoclorito de sódio	5	3,31	100,46	3,40	99,73
Hipoclorito de sódio	1	3,27	100,94	3,46	101,63
Hipoclorito de sódio	0,2	3,34	102,62	3,51	102,89
F tratamentos		294,27		939,83	
C.V. (%)		9,34		4,86	
D.M.S - Teste T a 5%		0,19	5,96	3,20	3,20
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		3,46	105,97	6,61	103,21
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		3,07	94,03	0,20	96,79

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. % = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;6;21)} = 2,57$; $F_{\text{tab.}(0,01;6;21)} = 3,81$.

Tabela 9. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 3a e em sua duplicata 3b, expressos em mg L⁻¹ e em porcentagem da média da testemunha.

Herbicida ou composto	Concentração (mg L ⁻¹)	Ensaio 3a		Ensaio 3b	
		µg L ⁻¹	% da Testemunha	µg L ⁻¹	% da Testemunha
Testemunha	-	380,86	100,00	417,187	100,00
Sulfato de cobre	5	126,91	33,32	110,469	26,48
Sulfato de cobre	1	86,68	22,76	82,618	19,80
Sulfato de cobre	0,2	130,59	34,29	201,953	48,41
Hipoclorito de sódio	5	404,3	106,15	393,750	94,38
Hipoclorito de sódio	1	419,14	110,05	527,734	126,50
Hipoclorito de sódio	0,2	456,25	119,79	491,406	117,79
F tratamentos		73,04		74,82	
C.V.(%)		13,30		13,33	
D.M.S - Teste T a 5%		39,59	10,39	44,06	10,56
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		420,45	110,40	461,25	110,56
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		341,26	89,60	373,11	89,44

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; F_{tab.(0,05;6;21)} = 2,57; F_{tab.(0,01;6;21)} = 3,81.

O sulfato de cobre é considerado um eficiente algicida em dosagens da ordem de 0,5mg L⁻¹, além de proporcionar efeito algistático sobre o crescimento de cianobactérias até 7 dias após a aplicação, no entanto, sua aplicação pode provocar lise celular, acarretando a liberação das toxinas para a água (FAN et al., 2013).

O hipoclorito de sódio não demonstrou capacidade de controlar *M. aeruginosa* nas concentrações e condições em que foi avaliado. Não houve efeitos expressivos deste composto sobre os teores de clorofila α ou de microcistina LR.

A análise da Figura 11 evidencia que o único ponto sobre a linha de equivalência (traço na transversal) é o corresponde ao tratamento testemunha sem aplicação dos agentes de controle em teste. Todos os demais pontos estão acima da linha de equivalência, indicando, de modo similar ao observado para o estudo 2, que todos os compostos em teste ou estimularam a produção da toxina ou reduziram de modo mais intenso os teores de clorofila α do que o fizeram com os teores de microcistina LR.

Apenas o sulfato de cobre foi efetivo em reduzir o crescimento de *M. aeruginosa* e a acumulação da microcistina LR. Mesmo na menor concentração (0,2mg L⁻¹) esse composto foi eficiente, destacando-se os efeitos mais intensos sobre os teores de clorofila α do que sobre os teores de microcistina LR.

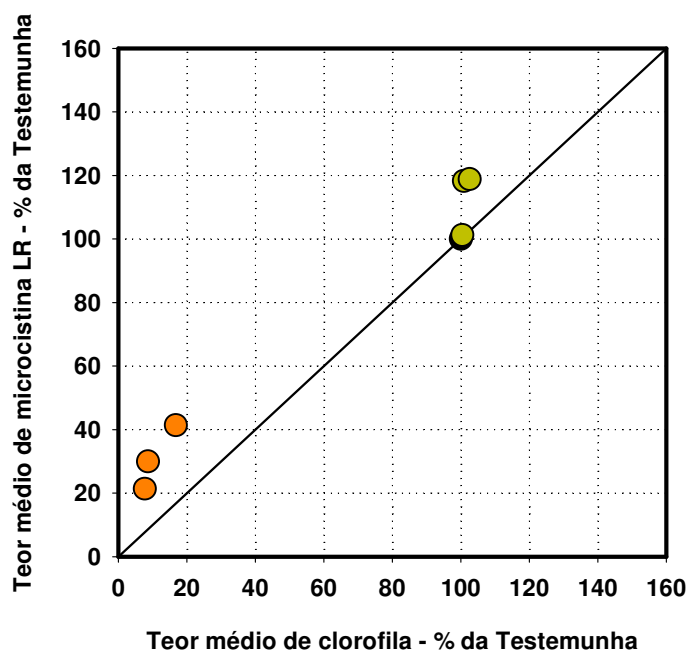


Figura 11. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha. (●), (○) e (●) correspondem respectivamente aos tratamentos: testemunha, sulfato de cobre e hipoclorito de sódio.

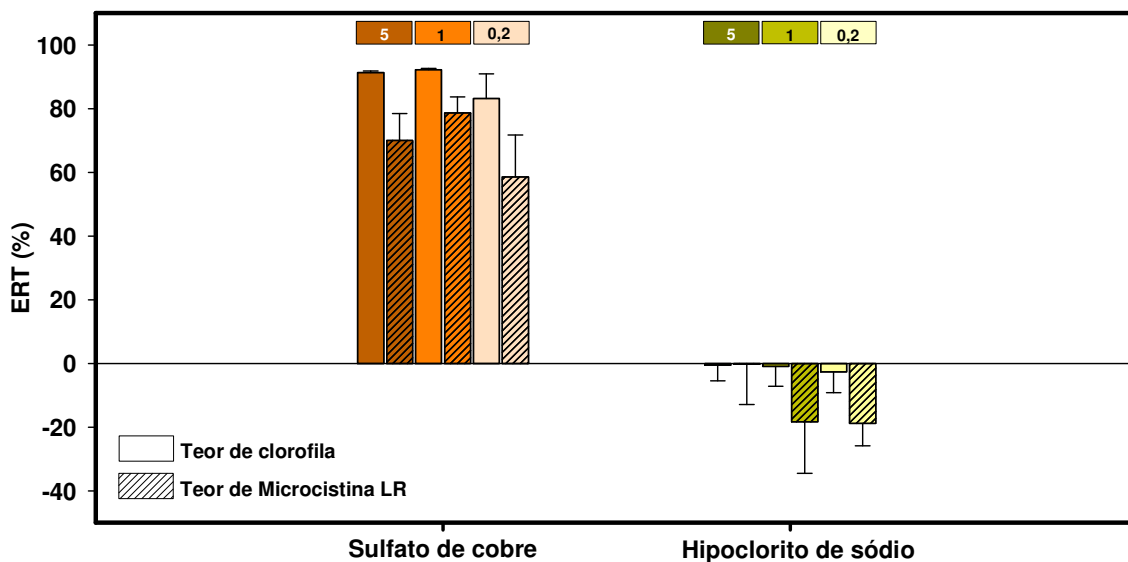


Figura 12. Eficiência relativa dos tratamentos (ERT - %): sulfato de cobre e hipoclorito de sódio em relação ao teor médio de clorofila α e microcistina LR total nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6.4 Estudo 4: Avaliação da eficiência de dosagens de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de *Microcystis aeruginosa*

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência dos herbicidas diquat e diuron, além do sulfato de cobre, no controle de *M. aeruginosa* em concentrações inferiores às que já haviam sido avaliadas nos estudos anteriores. Portanto foram testadas as concentrações de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2mg L⁻¹. Ainda assim, essas concentrações podem ser consideradas relativamente altas quando são transformadas em doses por unidade de área de reservatório. Tomando como exemplo a menor concentração (0,025mg L⁻¹ ou 0,025ppm ou 25ppb), para tratar um hectare de um lago com 4m de profundidade, seriam necessários 1Kg do composto. De modo similar, para alcançar as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2mg L⁻¹, seriam necessários 2, 4 e 8Kg, respectivamente.

Nas Tabelas 10 e 11 são apresentadas as informações referentes aos teores de clorofila α e microcistina LR observados no Ensaio 4a e em suplicata 4b, assim como foi apresentado para os Estudos 1 a 3. Na Figura 13 é representada a relação entre as médias dos teores de clorofila α e microcistina LR total e na Figura 14 a eficiência relativa dos tratamentos.

O diquat demonstrou elevado potencial de controle de *M. aeruginosa* nas concentrações de 0,1 e 0,2mg L⁻¹. Essas concentrações do diquat reduziram os teores de clorofila α em mais de 92% e os teores de microcistina LR ao redor de 82%. O diquat é um herbicida de contato, usado para o controle de plantas aquáticas em alguns países. Apresenta rápida degradação pela ação da luz e inativação por adsorção aos sedimentos. É um inibidor competitivo de transporte de elétrons do fotossistema I que acaba provocando estresse oxidativo nas células. No entanto, é considerado letal para muitos organismos primários não alvos (PHLIPS; HANSEN; VELARDI, 1992).

Considerando apenas os teores de clorofila α , o diuron pode ser considerado mais efetivo que o diquat nas menores concentrações e menos efetivo nas concentrações de 0,1 e 0,2mg L⁻¹. Considerando os teores de microcistina LR, o diuron foi bastante efetivo em reduzi-los em todas as concentrações testadas. O diuron é considerado um algicida, pois pode inibir a fotossíntese de algas, impedindo a produção de oxigênio e a transferência de elétrons a nível de fotossistema II (GIACOMAZZI; COCHET, 2004). Resposta similar foi encontrado por Zhou et al. (2013), sendo que o diuron provocou a morte celular de *M. aeruginosa* inibindo a fotossíntese através do bloqueio da transferência

de elétrons no fotossistema II. No entanto, a toxicidade para outras espécies aquáticas, a persistência, a incerteza dos produtos de degradação pode ser uma preocupação durante a aplicação de diuron (ZHOU et al., 2013).

Quando utilizado na concentração de $0,2\text{mg L}^{-1}$, o sulfato de cobre foi efetivo na redução dos teores de clorofila α e microcistina LR, demonstrando potencial de controle de *M. aeruginosa*. Por outro lado, o cobre é considerado um metal pesado que se acumula no sedimento, assim o uso do sulfato do cobre é considerado inadequado para uso dos lagos naturais, devido a sua persistência e toxicidade indiscriminada (FAN et al., 2013). Além disso, pode ser ineficaz em longo prazo eliminando florações de cianobactérias por causa do desenvolvimento de espécies/cepas de cianobactérias resistentes a cobre (GARCIA-VILLADA et al., 2004).

Tabela 10. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 4a e em sua duplicata 4b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Herbicida ou composto	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 4a		Ensaio 4b	
		mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	-	3,15	100,00	3,46	100,00
Diquat	0,025	2,94	93,31	3,09	89,39
Diquat	0,05	2,70	85,75	2,60	75,20
Diquat	0,1	0,26	8,31	0,29	8,47
Diquat	0,2	0,28	9,08	0,27	7,94
Diuron	0,025	1,90	60,49	1,86	53,78
Diuron	0,05	1,39	44,10	1,31	37,87
Diuron	0,1	1,04	33,13	1,05	30,49
Diuron	0,2	0,93	29,72	0,90	26,03
Sulfato de cobre	0,025	3,29	104,59	3,27	94,60
Sulfato de cobre	0,05	2,76	87,73	2,89	83,62
Sulfato de cobre	0,1	2,33	74,03	2,40	69,55
Sulfato de cobre	0,2	0,38	12,10	0,49	14,28
F tratamentos		304,83		182,93	
C.V. (%)		7,25		9,48	
D.M.S - Teste T a 5%		0,13	4,19	0,17	5,26
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		3,28	104,18	3,63	105,25
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		3,02	95,814	3,28	94,74

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;12;39)} = 2,01$; $F_{\text{tab.}(0,01;12;39)} = 2,67$.

Tabela 11. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 4a e em sua duplicata 4b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Herbicida ou composto	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 4a		Ensaio 4b	
		$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha
Testemunha	-	580,86	100,00	598,05	100,00
Diquat	0,025	488,67	84,13	500,00	83,61
Diquat	0,05	495,70	85,34	493,36	82,50
Diquat	0,1	106,88	18,40	101,99	17,05
Diquat	0,2	93,16	16,04	101,68	17,00
Diuron	0,025	139,10	23,95	149,02	24,92
Diuron	0,05	139,41	24,00	134,02	22,41
Diuron	0,1	105,23	18,12	110,08	18,41
Diuron	0,2	114,49	19,71	127,38	21,30
Sulfato de cobre	0,025	635,16	109,35	619,14	103,53
Sulfato de cobre	0,05	567,58	97,71	498,83	83,41
Sulfato de cobre	0,1	475,39	81,84	520,70	87,07
Sulfato de cobre	0,2	131,68	22,67	145,74	24,37
F tratamentos		111,96		77,17	
C.V. (%)		13,46		15,76	
D.M.S. - Teste T a 5%		42,66	7,34	50,26	8,40
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		623,52	107,34	648,31	108,40
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		538,20	92,66	547,79	91,60

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;12;39)} = 2,01$; $F_{\text{tab.}(0,01;12;39)} = 2,67$.

A análise da Figura 13 evidencia que os quatro pontos que representam os teores de clorofila α e microcistina LR total nos tratamentos com uso do diuron estão bastante abaixo da linha de equivalência, indicando que, nos Ensaios 4a e 4b, esse herbicida foi mais efetivo em reduzir os teores de microcistina LR total do que em reduzir os teores de clorofila α . Os pontos que representam os tratamentos com uso de diquat ou sulfato de cobre estão muito próximos à linha de equivalência, indicando que os efeitos sobre os teores de clorofila α e sobre os teores de microcistina LR foram de intensidade similar.

A aplicação dos compostos algicidas/algistáticos deve ser realizada em fases iniciais de floração de cianobactérias quando as densidades celulares são baixas para diminuir a liberação de metabólitos intracelulares (toxinas), se houver altas densidades de cianobactérias nos reservatórios.

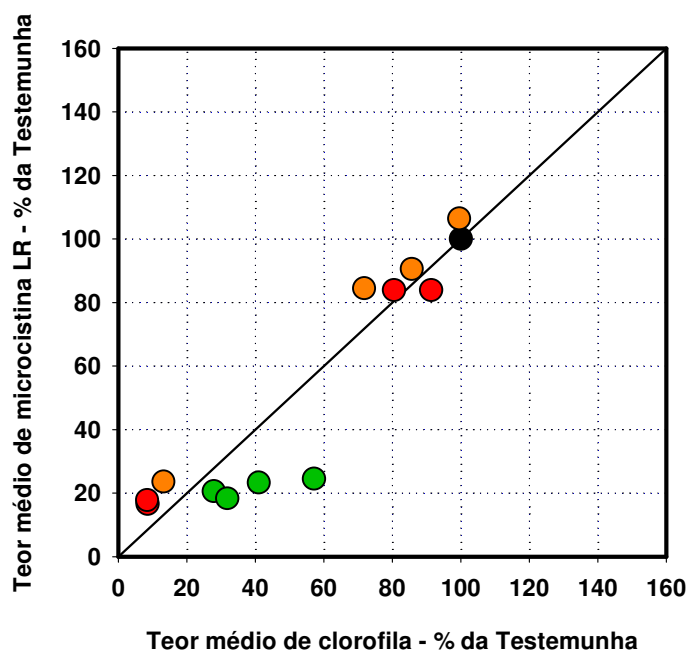


Figura 13. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha. (●), (●), (●) e (●) correspondem respectivamente aos tratamentos: testemunha, diquat, diuron e sulfato de cobre.

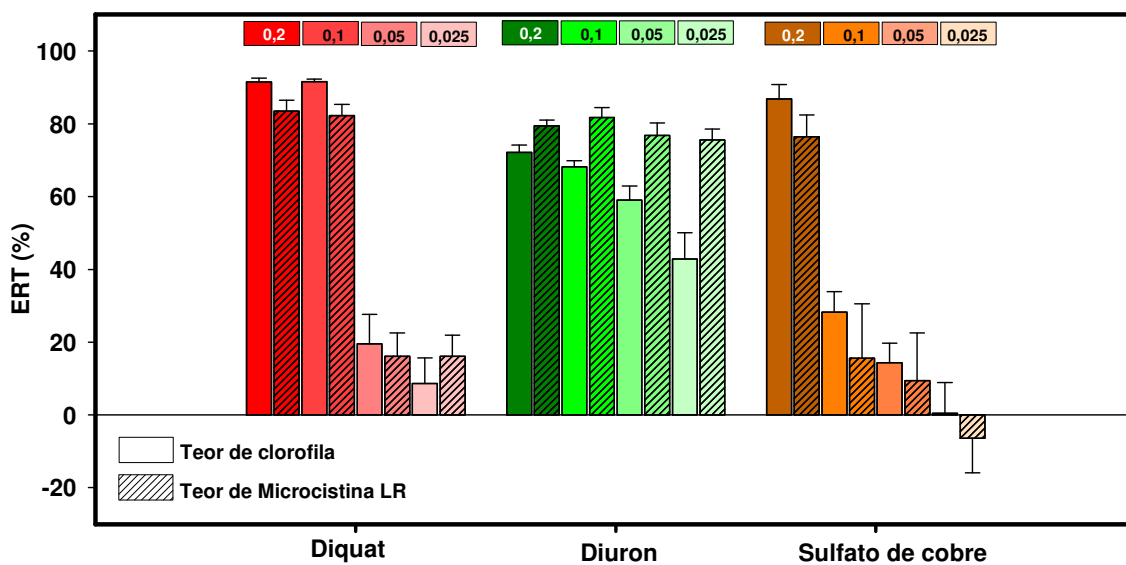


Figura 14. Eficiência relativa dos tratamentos (ERT - %): diquat, diuron e sulfato de sobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total nas concentrações de 0,2, 0,1, 0,05 e 0,025mg L⁻¹. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6.5 Estudo 5: Efeito de diquat, diuron e sulfato de cobre no controle de *M. aeruginosa* em altas densidades

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência dos herbicidas diquat e diuron, além do sulfato de cobre no controle de *M. aeruginosa* sob alta densidade de cianobactérias. Nesse estudo as concentrações dos agentes de controle avaliadas foram 5, 1 e, 0,2mg L⁻¹.

Nas Tabelas 12 e 13 são apresentadas as informações referentes aos teores de clorofila α e microcistina LR total observado no Ensaio 5a e em sua duplicata 5b, respectivamente. Os coeficientes de variação foram superiores aos observados na maioria dos ensaios anteriores. Esse comportamento possivelmente está associado à alteração das condições experimentais. De modo similar ao que foi apresentado para os Estudos 1 a 4, na Figura 15 é representado a relação entre as médias dos teores de clorofila α e microcistina LR total e na Figura 16 a eficiência relativa dos tratamentos.

Considerando as parcelas sem aplicações dos agentes de controle, foram observados valores relativamente altos (em relação aos demais ensaios), para os teores totais de microcistina LR e clorofila α . Esse comportamento era esperado em função do acréscimo de sete dias no período de incubação dessas parcelas.

Considerando as médias dos teores de clorofila α , expressos em porcentagem das testemunhas, conforme apresentado na Tabela 12 e Figura 16, fica evidente que o diquat foi o agente de controle de maior eficiência. Para todos os compostos houve aumento de eficácia com a elevação da concentração. O diquat e o sulfato de cobre demonstraram menor eficiência no controle da cianobactéria na condição experimental utilizada nesse estudo (com pré-inoculação por 14 dias) do que nos estudos anteriores em que a inoculação foi realizada no mesmo dia.

Ao analisar a Tabela 13 e Figura 16 é possível verificar que os agentes de controle em teste praticamente não afetaram os teores da toxina. Os menores teores médios foram encontrados no tratamento com aplicação do diquat na concentração de 5mg L⁻¹, mas correspondendo a 82,89% dos valores médios observados nas testemunhas.

Tabela 12. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 5a e em sua duplicata 5b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Substâncias	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 5a		Ensaio 5b	
		mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	-	4,44	100,00	4,14	100,00
Diquat	5	0,12	2,82	0,13	3,21
Diquat	1	0,76	17,26	1,06	25,72
Diquat	0,2	0,58	13,06	1,17	28,30
Diuron	5	1,75	39,50	1,79	43,19
Diuron	1	2,02	45,64	1,71	41,35
Diuron	0,2	2,59	58,34	2,04	49,45
Sulfato de cobre	5	0,22	5,07	0,28	6,89
Sulfato de cobre	1	0,66	15,00	0,86	20,94
Sulfato de cobre	0,2	2,81	63,43	2,39	57,83
F tratamentos		107,90		50,42	
C.V. (%)		16,74		21,02	
D.M. S. - Teste T a 5%		0,27	6,15	0,33	8,09
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		4,71	106,15	4,77	108,09
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		4,17	93,85	3,81	91,91

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S.= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab}}(0,05;9;30)= 2,21$; $F_{\text{tab}}(0,01;9;30)= 3,06$.

Tabela 13. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 5a e em sua duplicata 5b, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ e em porcentagem da média da testemunha.

Substâncias	Concentração (mg L^{-1})	Ensaio 5a		Ensaio 5b	
		$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha
Testemunha	-	763,28	100,00	733,98	100,00
Diquat	5	589,45	77,23	650,00	88,56
Diquat	1	638,28	83,62	825,00	112,40
Diquat	0,2	745,70	97,70	756,25	103,03
Diuron	5	817,58	107,11	773,83	105,43
Diuron	1	830,08	108,75	831,25	113,25
Diuron	0,2	674,22	88,33	676,56	92,18
Sulfato de cobre	5	694,92	91,04	664,45	90,53
Sulfato de cobre	1	612,11	80,19	657,42	89,57
Sulfato de cobre	0,2	820,70	107,52	899,61	122,57
F tratamentos		2,02		2,41	
C.V. (%)		126,87		14,84	
D.M.S. - Teste T a 5%		126,87	16,88	113,27	15,41
I.C. Teste T a 5% - Limite superior		890,15	116,88	847,25	115,41
I.C. Teste T a 5% - Limite inferior		636,41	83,12	620,71	84,59

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5%= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab}}(0,05;9;30)= 2,21$; $F_{\text{tab}}(0,01;12;39)= 3,06$.

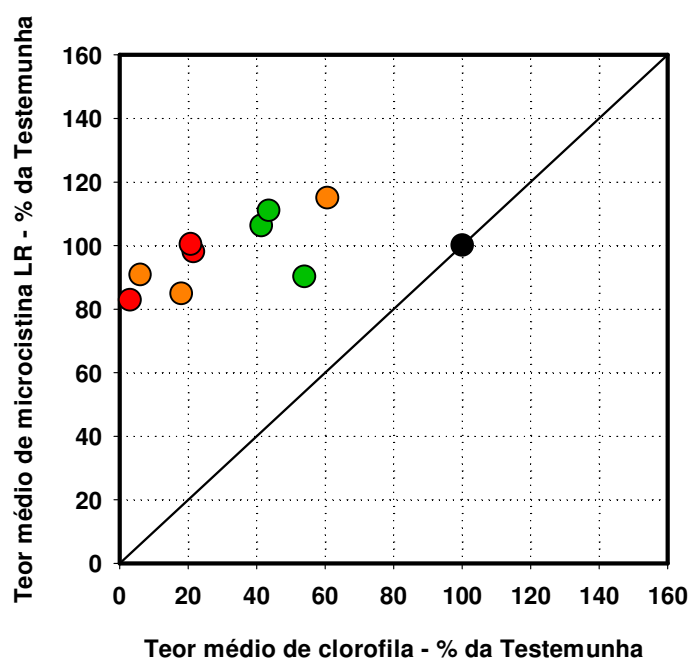


Figura 15. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha. (●), (●), (●) e (●) correspondem respectivamente aos tratamentos: testemunha, diquat, diuron e sulfato de cobre.

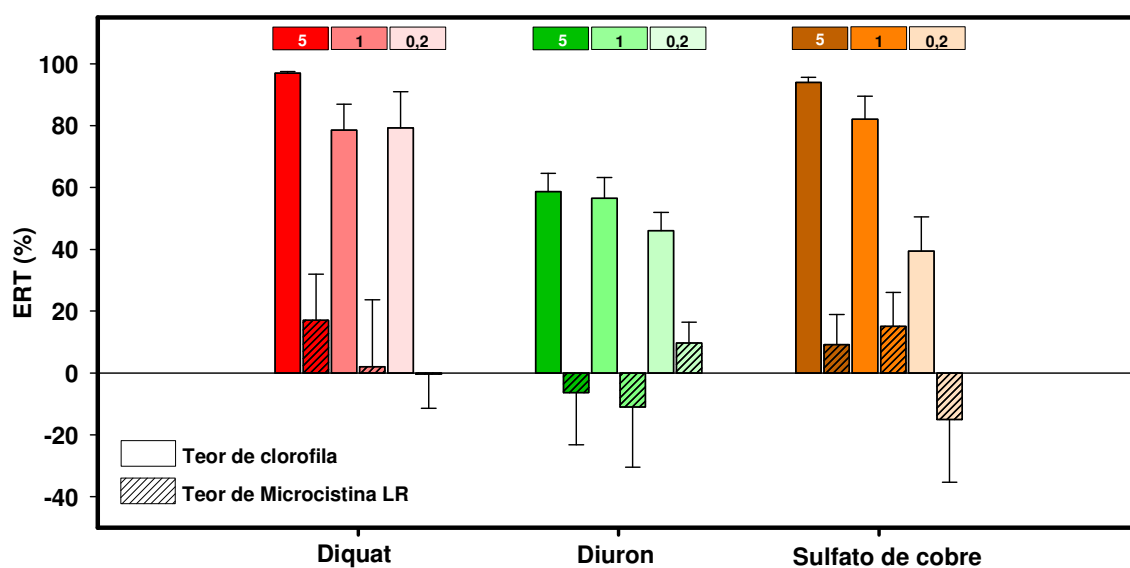


Figura 16. Eficiência relativa dos tratamentos (ERT - %): diquat, diuron e sulfato de sobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total nas concentrações de 5, 1 e 0,2mg L⁻¹. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

Observando a eficiência relativa dos tratamentos nota-se que os agentes de controle testados podem ser eficazes no controle de *M. aeruginosa* e que a eficiência depende da concentração aplicada (Figura 16). Contudo, os agentes não foram eficazes na redução dos teores de microcistina LR nesta condição experimental em que as colônias da cianobactéria haviam crescido previamente por 14 dias. Em condições de alta densidade de *M. aeruginosa* os compostos utilizados podem controlar a cianobactéria, mas a contaminação da água com a toxina se mantém. Essa observação deixa claro que o controle de *M. aeruginosa* precisa ser feito em fases iniciais das florações, quase que preventivamente, para que elevados teores da toxina não sejam alcançados.

Na Figura 17 são representados os teores totais, intracelulares e extracelulares de microcistina LR em função dos teores de clorofila α observados nas 80 unidades experimentais, referente aos ensaios 5a e 5b. A análise da Figura 17-A evidencia que os teores totais de microcistina LR apresentaram comportamento praticamente independente dos teores de clorofila α , evidenciando, uma vez mais, que o controle exercido pelos compostos testados (diquat, diuron e sulfato de cobre) não teve efeito sobre os teores da toxina e reforçando a conclusão sobre a necessidade de controle da cianobactéria em fases iniciais de colonização.

A análise das Figuras 17-B e 17-C indicam que quando a aplicação dos agentes de controle reduziu os teores de clorofila α a valores inferiores ao inicial ($3,342\text{mg L}^{-1}$) houve o aumento dos teores extracelulares e a redução dos teores intracelulares de microcistina LR, respectivamente. Houve estabilização destes valores em patamares máximo e mínimo, respectivamente, quando os teores de clorofila α encontram-se abaixo de $1,7\text{mg L}^{-1}$, ou seja, com controle da cianobactéria superior a 50% (tomando-se como referencial os teores finais de clorofila α no tratamento testemunha). Mesmo alcançando patamares, há expressiva variação dos dados referentes aos teores extracelulares da toxina. O mesmo não ocorreu para os teores intracelulares, principalmente para teores de clorofila α inferiores a $1,5\text{mg L}^{-1}$.

A observação conjunta dessas informações (Figura 17) evidencia que a detecção de microcistina em elevadas concentrações não é uma indicação segura da presença de alto nível de atividade da cianobactéria. Para decidir sobre a necessidade e viabilidade de agentes de controle é necessário determinar os teores intra e extracelulares da toxina em separado. A determinação do teor intracelular da toxina pode ser ferramenta útil na estimativa de cianobactérias em coleções de água, por ser altamente específica.

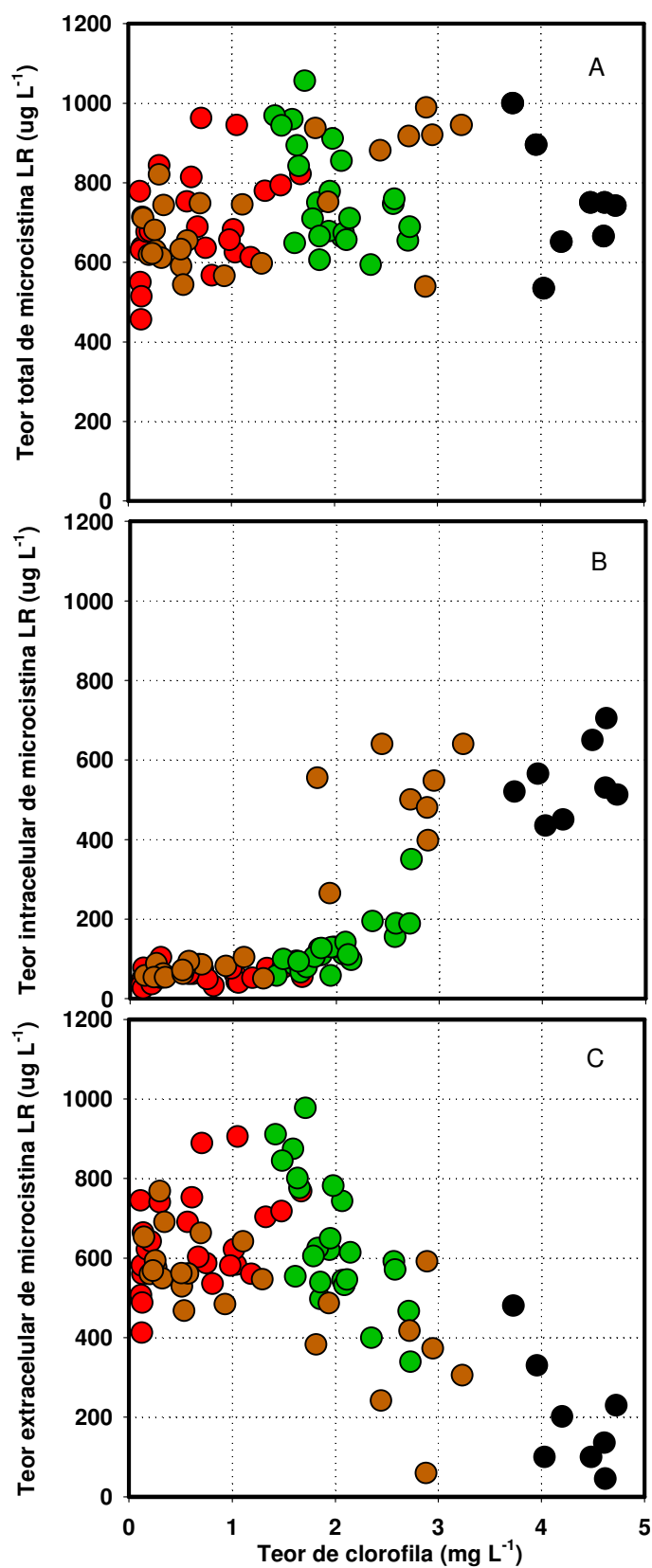


Figura 17. Relação entre os teores de clorofila α e os teores totais (A), os intracelulares (B) e, extracelulares (C) de microcistina LR nos ensaios 5a e 5b. (●), (●), (●) e (●) correspondem aos tratamentos testemunha, diquat, diuron e sulfato de cobre, respectivamente.

As opções de manejo e adoção de práticas de mitigação dos riscos que as cianotoxinas oferecem dependem se essas toxinas são intracelulares ou extracelulares. Portanto, se as toxinas são principalmente intracelulares, a simples remoção das células pode reduzir consideravelmente a ameaça da toxina, mas se a toxina é extracelular é necessário tratamentos químicos mais complexos e caros (BLACK; YILMAZ; PHILIPS, 2011).

A longevidade dos efeitos tóxicos de florações de *M. aeruginosa* em ecossistemas depende de fatores que aceleram a degradação ou a diluição da toxina, tais como a radiação ultravioleta, oxidantes fortes, bactérias naturais que desativam, por exemplo, além de considerações hidrológicas, tais como tempo de residência da água, dentre outros fatores (BLACK; YILMAZ; PHILIPS, 2011). Portanto, uma vez que a toxina foi liberada na água a remediação dos riscos são essenciais.

6.6 Estudo 6: Avaliação do efeito de biomassa foliar de espécies nativas e adubos verdes no controle de *M. aeruginosa*

Nesse estudo, biomassas foliares de 47 espécies foram avaliadas quanto ao potencial de inibir o crescimento de *M. aeruginosa*. Para isso, as espécies foram divididas em dois lotes, passando a ser designados como Lote 1 (ensaio 6a e sua duplicata 6b) e Lote 2 (ensaio 6c e sua duplicata 6d). Os valores e os detalhes da análise estatística tanto do teor de clorofila α , como da concentração de microcistina LR total são apresentados nas Tabelas de 14 a 17. Nas Figuras 18 e 19 é representada a relação entre as médias dos teores de clorofila α e microcistina LR total, respectivamente para cada lote estudado e, nas Figuras 20 e 21 a eficiência relativa dos tratamentos.

Todas as biomassas foram avaliadas utilizando concentração equivalente a 100mg L^{-1} e, após cinco dias de incubação somente aqueles que proporcionaram reduções do teor médio de clorofila α superiores a 50% foram considerados promissores para o controle de *M. aeruginosa*.

A biomassa foliar de *Guatteria australis* ocasionou forte inibição do crescimento de *M. aeruginosa*, apresentando um teor médio de clorofila α da ordem de 2,47% em comparação ao da testemunha, ou seja, redução de 97,5%. O teor de microcistina LR total também foi fortemente afetado (8,82% em relação ao teor da

testemunha). A *G. australis* é uma árvore brasileira da família Annonaceae, conhecida popularmente por cortiça ou pindaúva-preta, é endêmica da Mata Atlântica e com registro na lista de flora ameaçada de extinção, principalmente nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (LORENZI, 1992). Recentemente, Siqueira et al. (2015) determinaram a composição química do óleo essencial das folhas de *G. australis*, sendo 23 compostos identificados, principalmente germacreno B, germacreno D, (E) cariofileno e espatulenol. Os autores ainda mencionaram que o óleo essencial das folhas dessa espécie demonstra consideráveis efeitos antileishmaniose e citotóxicos.

A biomassa foliar de *Pterogyne nitens* também demonstrou considerável inibição do teor de clorofila α (21,19%) e da concentração de microcistina LR total (17,57%), ambos em relação à testemunha. Essa espécie arbórea é pertencente à família Fabaceae subfamília Caesalpinioideae conhecida popularmente como amendoim-bravo, é nativa do Cerrado do Brasil, Argentina e Paraguai, porém também está incluída na lista de espécies brasileiras em extinção (NOGUEIRA, 2010). Esta planta é a única representante do gênero *Pterogyne*, várias substâncias flavononas e alcalóides guanidina já foram isoladas e identificadas, sugerindo potencial atividade anti-cancer (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995), inibidores mieloperoxidase (REGASINI et al., 2008), além de estimular a atividade ATPase ABCB1 em humanos (TAJIMA et al., 2014).

A biomassa de *Handroanthus ochroceus* também apresentou teores médios de clorofila de 26,35% e o de microcistina LR total de 27,47% em relação a testemunha. Essa espécie pertence à família Bignoniaceae, possui hábito arbóreo e é conhecida popularmente como ipê-amarelo-do-cerrado (LORENZI, 1992). No Brasil é amplamente distribuída pelo território nacional, mas ocorre principalmente no Cerrado (LORENZI, 1992).

Por fim, a biomassa foliar de *Copaifera langsdorffii* apresentou teores de clorofila de 40,19% e microcistina LR 39,73%. O gênero *Copaifera* pertence à família botânica Leguminosae, sub-família Caesalpinioideae. No Brasil, mais de 20 espécies têm sido descritas e todas elas apresentam relatos de aplicações terapêuticas na medicina popular (SARAIVA et al., 2015), como por exemplo, neuroprotetor (BOTELHO et al., 2015), anti-inflamatório (PAIVA et al., 2002), antitumoral, antioxidante (BOTELHO et al., 2015), anti-leishmaniose e anti-malárias (SOUZA et al., 2012). Dentre as espécies, *C. langsdorffii* tem sido sugerida como uma fonte natural de produtos promissores para o mercado farmacêutico (COSTA et al., 2015).

Tabela 14. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 6a e em sua duplicata 6b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Espécie	Ensaio 6a		Ensaio 6b	
	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	2,77	100,00	4,38	100,00
<i>Guatteria australis</i>	0,04	1,52	0,15	3,42
<i>Pterogyne nitens</i>	0,65	23,69	0,81	18,68
<i>Handroanthus ochraceus</i>	0,67	24,30	1,26	28,78
<i>Copaifera langsdorffii</i>	1,08	39,28	1,80	41,09
<i>Tabebuia roseoalba</i>	1,31	47,55	3,36	76,75
<i>Swietenia macrophylla</i>	1,82	65,87	4,19	95,62
<i>Annona sylvatica</i>	1,93	69,77	2,75	62,83
<i>Eugenia brasiliensis</i>	2,85	103,08	3,76	86,02
<i>Bixa orellana</i>	3,01	108,68	3,31	75,67
<i>Gallesia integrifolia</i>	3,13	113,20	4,63	105,83
<i>Ormosia arborea</i>	3,20	115,62	3,50	80,04
<i>Calophyllum brasiliensis</i>	3,26	117,57	4,52	103,18
<i>Cassia grandis</i>	3,27	118,22	4,19	95,66
<i>Citharexylum myrianthum</i>	3,42	123,52	4,99	113,94
<i>Gallesia integrifolia</i>	3,58	129,16	3,84	87,65
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	3,61	130,34	3,36	76,70
<i>Croton floribundus</i>	3,64	131,53	3,88	88,60
<i>Pouteria caimito</i>	3,79	136,76	4,10	93,72
<i>Hymenaea courbaril</i>	3,86	139,52	4,55	103,99
<i>Inga sp.</i>	4,02	145,22	3,31	75,62
<i>Erythrina falcata</i>	4,08	147,13	4,22	96,39
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	4,27	154,07	4,57	104,48
<i>Swartzia langsdorffii</i>	4,78	172,45	4,06	92,71
F tratamentos	41,89		17,22	
C.V. (%)	13,98		17,57	
D.M.S. - Teste T a 5%	0,39	14,27	0,61	13,92
IC Teste T a 5% - Limite superior	3,16	114,27	4,99	113,92
IC Teste T a 5% - Limite inferior	2,37	85,72	3,77	86,07

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;23;72)} = 1,68$; $F_{\text{tab.}(0,01;23;72)} = 2,07$.

Tabela 15. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 6a e em sua duplicata 6b, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ e em porcentagem da média da testemunha.

Espécie	Ensaio 6a		Ensaio 6b	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha
Testemunha	2.145,0	100,00	2.328,75	100,00
<i>Guatteria australis</i>	92,76	4,32	310,12	13,32
<i>Handroanthus ochraceus</i>	215,44	10,04	1.045,87	44,91
<i>Pterogyne nitens</i>	310,31	14,47	481,50	20,68
<i>Copaifera langsdorffii</i>	651,09	30,35	1.143,75	49,11
<i>Tabebuia roseoalba</i>	700,78	32,67	1.985,25	85,25
<i>Annona sylvatica</i>	736,87	34,35	1.912,50	82,13
<i>Eugenia brasiliensis</i>	1.307,67	60,96	2.123,25	91,18
<i>Gallesia integrifolia</i>	1.380,00	64,34	2.246,25	96,46
<i>Bixa orellana</i>	1.452,19	67,70	2.433,75	104,51
<i>Citharexylum myrianthum</i>	1.570,78	73,23	2.343,75	100,64
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	1.570,78	73,23	2.737,50	117,55
<i>Ormosia arborea</i>	1.577,81	73,56	2.351,25	100,96
<i>Inga sp.</i>	1.611,56	75,13	1.538,25	66,05
<i>Pouteria caimito</i>	1.635,93	76,27	2.335,87	100,31
<i>Swietenia macrophylla</i>	1.651,87	77,01	2.587,50	111,11
<i>Calophyllum brasiliensis</i>	1.842,65	85,90	2.576,25	110,63
<i>Cassia grandis</i>	1.925,15	89,75	2.793,75	119,97
<i>Hymenaea courbaril</i>	1.947,65	90,80	2.088,75	89,69
<i>Gallesia integrifolia</i>	2.017,03	94,03	2.250,00	96,62
<i>Croton floribundus</i>	2.051,72	95,65	2.245,12	96,41
<i>Swartzia langsdorffii</i>	2.114,06	98,56	2.463,75	105,80
<i>Erythrina falcata</i>	2.198,43	102,49	2.403,75	103,22
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	2.264,06	105,55	2.310,00	99,19
F tratamentos	51,81		17,27	
C.V. (%)	12,57		15,65	
D.M.S. - Teste T a 5%	182,63	8,51	318,81	13,69
IC Teste T a 5% - Limite superior	2.327,63	108,51	2.647,56	113,69
IC Teste T a 5% - Limite inferior	1.962,36	91,48	2.009,93	86,31

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;23;72)} = 1,68$; $F_{\text{tab.}(0,01;23;72)} = 2,07$.

Para a maioria das biomassas foliares avaliadas apenas fracas inibições dos teores de clorofila e microcistina LR total foram observadas, demonstrando que a adição das biomassas não afetou o crescimento de *M. aeruginosa*. Para algumas biomassas específicas, houve incrementos nos teores de clorofila α , representados por valores superiores aos 100% da escala relativa (testemunha), mas os teores de microcistina LR total se mantiveram próximos a 100%, muito provavelmente devido a disponibilização de nutrientes para o meio (Figuras 20 e 21). Ball et al (2001) relata que a adição de palha de trigo na concentração de 1% dobrou a quantidade de clorofila α ao fim do período analisado (28 dias), discutindo que o apodrecimento da palha de trigo lixiviou nutrientes para água possibilitando o aumento da biomassa das algas, conforme observado para a maioria das espécies de adubo verde (Tabela 16 e Figura 21).

Aplicação de palha de cevada pode controlar florações de cianobactérias. As quantidades de palha de cevada eficazes de inibição de florações de cianobactérias variaram entre 0,1 a 7,2g (peso seco) L⁻¹, conforme revisão realizada por Xiao et al. (2010), ou seja, convertendo os valores é o equivalente a 1 a 72 toneladas de material seco por hectare de água (10.000m² x 1m de profundidade). No Brasil, a cevada é uma cultura agrícola de inverno, com o cultivo restrito na Região Sul do país. Seus restos culturais são da ordem de 4,7 toneladas por hectare e normalmente é utilizada como material de cobertura no sistema de plantio direto (DOURADO; SILVA; BOLONHEZI, 2001). Desse modo, devido à amplitude do país é necessário buscar outras matérias primas que sejam cultivadas em outras regiões do país, ou seja, as regiões Centro-oeste, Nordeste e Norte. Como exemplo as crotalarias que são leguminosas que produzem entre 10 a 15 toneladas de massa seca por hectare, podendo possibilitar interessantes. No entanto, como observado na Figura 21, as espécies de crotalarias não apresentaram uma eficiência no controle de *M. aeruginosa* e para algumas delas estimularam o desenvolvimento da cianobactéria. Muito provavelmente se deve a grande quantidade de nutrientes presentes na biomassa, uma vez que essas espécies são excelentes cicladoras de nutrientes do solo (BALL et al., 2001; DOURADO; SILVA; BOLONHEZI, 2001).

Alternativamente, nesse ensaio também foi proposto à exploração do efeito das matas ciliares, em especial aquelas cujo apresentam predominância de espécies com relatos de serem produtoras de compostos bioativos. Os compostos secundários, conhecidos como aleloquímicos, podem ser liberados para o ambiente por diversas formas, assim, quando estas espécies arbóreas estão próximas ao reservatório é

importantes conhecer o impacto que possam exercer no ambiente. Não foram encontrados relatos de ocorrência dessas interações culminando na redução dos casos de florações de cianobactérias. Mas é provável que a presença dessas espécies potenciais nas margens de reservatórios e lagoas, em uma condição que a ocorra a queda das folhas, o apodrecimento e a liberação de lixiviados podem acarretar em efeito nos eventos de florações de cianobactérias. Assim, estudos adicionais precisam ser realizados para explorar essa hipótese.

A análise das Figuras 18 e 19 evidencia que os teores de microcistina são proporcionais aos teores de clorofila, exceto para algumas espécies, cujos pontos estão abaixo da linha de equivalência indicando que essas biomassas estimularam o crescimento de *M. aeruginosa* de forma mais intensa do que a produção da toxina. Desse modo, para a maioria das biomassas avaliadas o efeito pode ser verificado apenas avaliando-se a concentração de clorofila α .

O procedimento aqui desenvolvido para triagem do potencial de controle de *M. aeruginosa* reúne como características uma metodologia simples, não necessita de complexas etapas para obtenção dos extratos e apenas pela quantificação de clorofila α , utilizando espectrofotometria é possível à obtenção de resultados dentro de poucos dias (5 dias). Também há grande vantagem por não usar processos de extração que envolvem solventes, para que não haja riscos de efeitos dos mesmos ou de seus contaminantes, serem confundidos com efeitos dos tratamentos.

Por fim, esse procedimento de triagem de biomassas também pode ter potencial para prever a presença de antibióticos em plantas, uma vez que as plantas que apresentaram maiores efeitos, já apresentavam histórico com vários outros efeitos. Desse modo, acredita-se que esse procedimento extremamente simples é capaz de antecipar alguns efeitos e prever respostas até para outras áreas que não seja de manejo de florações de cianobactérias.

Tabela 16. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 6c e em sua duplicata 6d, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Espécies	Ensaio 6c		Ensaio 6d	
	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	3,21	100,00	3,53	100,00
<i>Neomitranthes glomerata</i>	1,77	55,08	2,47	70,04
<i>Lafoensia pacari</i>	2,46	76,61	3,13	88,79
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	3,07	95,77	3,66	103,83
<i>Parapiptadenia rigida</i>	2,17	67,54	3,37	95,53
<i>Albizia polycephala</i>	2,32	72,20	3,44	97,70
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	3,05	94,96	3,50	99,42
<i>Psidium guajava</i>	2,78	86,61	4,14	117,46
<i>Genipa americana</i>	2,75	85,79	3,25	92,25
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	2,71	84,30	3,88	110,07
<i>Lecythis pisonis</i>	3,64	113,42	3,96	112,42
<i>Pterocarpus rohrii</i>	3,54	110,17	4,07	115,36
<i>Mucuna cinereum</i> cv. Comum	3,16	98,55	4,07	115,55
<i>Mucuna aterrima</i> cv. Comum	3,38	105,12	4,39	124,51
<i>Mucuna deeringiana</i> cv. Comum	3,35	104,46	4,35	123,27
<i>Mucuna pruriens</i> cv. Comum	3,66	113,89	4,14	117,49
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i>	3,28	102,15	4,29	121,56
<i>Cajanus cajan</i> cv. IAPAR 43	3,44	107,25	3,83	108,59
<i>Cajanus cajan</i> cv. IAC	3,77	117,40	4,11	116,67
<i>Neonotomia wightii</i> cv. Comum	3,81	118,75	3,80	107,87
<i>Crotalaria ochroleuca</i> cv. Comum	3,61	112,30	3,83	108,76
<i>Dolichos lablab</i> cv. Rongai	3,63	112,94	4,26	120,91
<i>Crotalaria breviflora</i> cv. Comum	3,75	116,84	4,08	115,75
<i>Crotalaria juncea</i> cv. IAC-KR1	3,00	93,60	3,62	102,58
<i>Lafoensia glyptocarpa</i>	2,61	81,33	2,65	75,29
F tratamentos	18,91		4,97	
C.V. (%)	8,13		11,93	
D.M.S. - Teste T a 5%	0,25	7,86	0,44	12,66
IC Teste T a 5% - Limite superior	3,46	107,86	3,97	112,66
IC Teste T a 5% - Limite inferior	2,96	92,13	3,08	87,34

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5%= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;24;75)} = 1,66$; $F_{\text{tab.}(0,01;24;75)} = 2,04$.

Tabela 17. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de microcistina LR total observados no Ensaio 6c e em sua duplicata 6d, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ e em porcentagem da média da testemunha.

Espécies	Ensaio	6c	Ensaio	6d
	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha	$\mu\text{g L}^{-1}$	% da Testemunha
Testemunha	2.039,06	100,00	3.689,06	100,00
<i>Neomitranthes glomerata</i>	1.418,91	69,59	1.940,63	52,60
<i>Lafoensia pacari</i>	2.132,81	104,60	2.690,63	72,94
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	2.063,44	101,20	3.145,31	85,26
<i>Parapiptadenia rigida</i>	1.632,19	80,05	3.103,13	84,12
<i>Albizia polycephala</i>	1.678,13	82,30	3.040,78	82,43
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	1.941,09	95,20	2.542,50	68,92
<i>Psidium guajava</i>	1.875,00	91,95	3.478,13	94,28
<i>Genipa americana</i>	1.843,59	90,41	2.775,00	75,22
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	1.899,84	93,17	3.867,19	104,83
<i>Lecythis pisonis</i>	2.325,00	114,02	3.510,94	95,17
<i>Pterocarpus rohrii</i>	2.301,56	112,87	3.487,50	94,54
<i>Mucuna cinereum</i> cv. Comum	2.160,94	105,98	3.187,50	86,40
<i>Mucuna aterrima</i> cv. Comum	2.067,19	101,38	4.068,75	110,29
<i>Mucuna deeringiana</i> cv. Comum	2.235,94	109,66	3.276,56	88,82
<i>Mucuna pruriens</i> cv. Comum	2.376,56	116,55	3.079,69	83,48
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i>	2.053,13	100,69	3.271,88	88,69
<i>Cajanus cajan</i> cv. IAPAR 43	2.264,06	111,03	2.671,41	72,41
<i>Cajanus cajan</i> cv. IAC	2.381,25	116,78	3.051,56	82,72
<i>Neonotomia wightii</i> cv. Comum	2.437,50	119,54	3.412,50	92,50
<i>Crotalaria ochroleuca</i> cv. Comum	2.418,75	118,62	3.764,06	102,03
<i>Dolichos lablab</i> cv. Rongai	2.101,88	103,08	3.164,06	85,77
<i>Crotalaria breviflora</i> cv. Comum	2.264,06	111,03	3.707,81	100,51
<i>Crotalaria juncea</i> cv. IAC-KR1	2.198,44	107,82	2.751,56	74,59
<i>Lafoensia glyptocarpa</i>	1.768,13	86,71	2.039,53	55,29
F tratamentos	6,31		2,87	
C.V. (%)	10,19		19,71	
D.M.S. - Teste T a 5%	210,72	10,33	618,25	16,76
IC Teste T a 5% - Limite superior	2.249,78	110,33	4.307,32	116,76
IC Teste T a 5% - Limite inferior	1.828,35	89,67	3.070,81	83,24

Obs: I.C. = Intervalo de Confiança para a média da testemunha; C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S. – Teste T a 5% = Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;24;75)} = 1,66$; $F_{\text{tab.}(0,01;24;75)} = 2,04$.

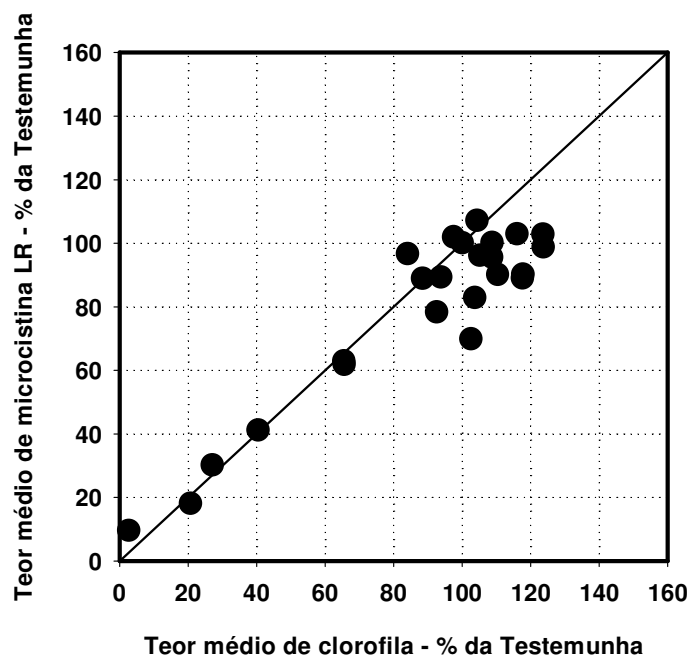


Figura 18. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha.

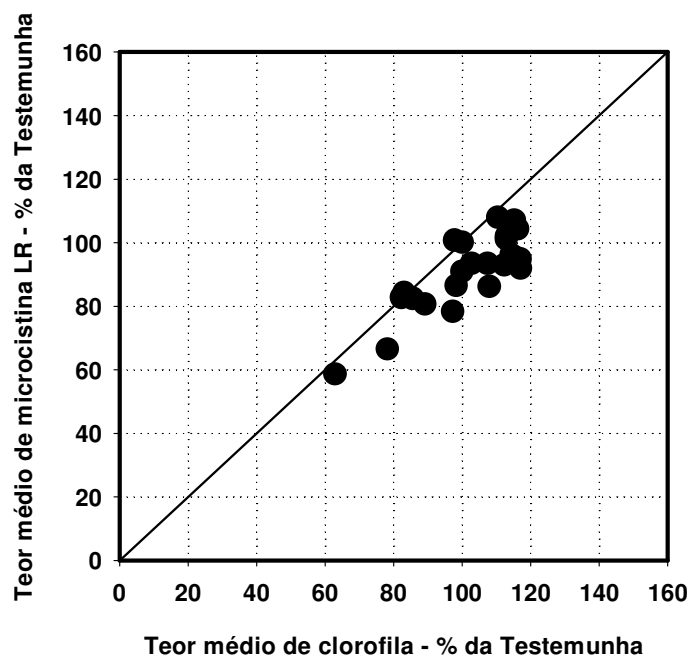


Figura 19. Relação entre os teores médios de clorofila α e microcistina LR, expressos em porcentagem das respectivas médias do tratamento testemunha.

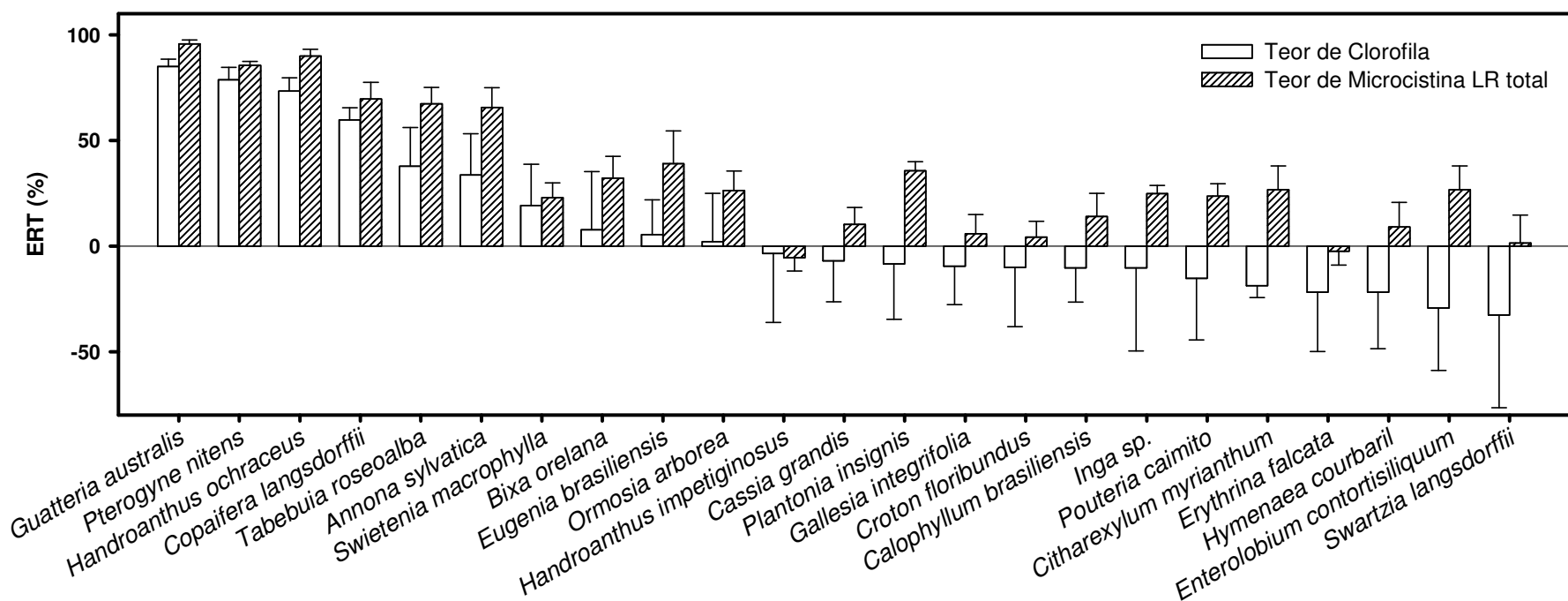


Figura 20. Eficiência Relativa dos diferentes Tratamentos (ERT - %) sobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total na concentração de 5mg L^{-1} , referente ao Lote 1. Os dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

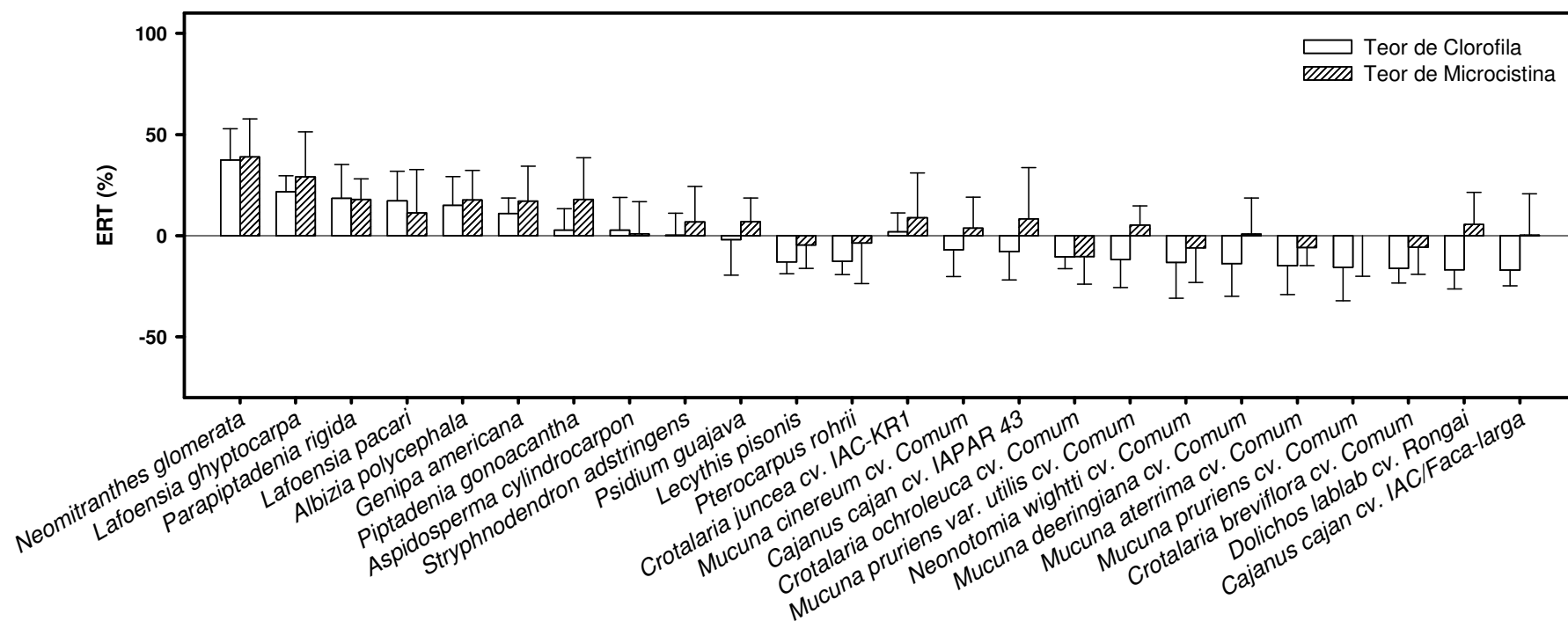


Figura 21. Eficiência Relativa dos diferentes Tratamentos (ERT - %) sobre o teor médio de clorofila α e microcistina LR total na concentração de 5mg L^{-1} , referente ao Lote 2. Os dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6.7 Estudo 7: Curva dose-resposta de biomassa foliar das espécies mais promissoras

As espécies *Guatteria australis*, *Pterogyne nitens*, *Handroanthus ochroceus* e *Copaifera langsdorffii* foram identificadas como as mais promissoras no Estudo 6 e nesse estudo foram avaliadas em diferentes concentrações com a finalidade de confirmar a atividade e determinar a dose-resposta das mesmas. Os teores de clorofila α para cada uma das espécies, tanto para o ensaio 7a, quanto para sua duplicata (7b) estão apresentados na Tabela 18. Quando possível um modelo matemático foi ajustado aos dados, como na Figura 22 ou então apenas plotados para demonstração (Figura 23).

Ficou evidente que as concentrações crescentes dos extratos foliares de *G. australis* e *P. nitens* afetaram significativamente o teor de clorofila α de *M. aeruginosa*, mostrando efeitos similares aos já encontrado no Estudo 6. A concentração média necessária para reduzir 50% do teor de clorofila α (DR₅₀) foi de 29,67mg L⁻¹ da biomassa de *G. australis* e de 33,72mg L⁻¹ de *P. nitens*. A maior dosagem de *G. australis* provocou redução de aproximadamente 95% do teor de clorofila α , enquanto que a mesma dosagem da biomassa foliar de *P. nitens* provocou apenas 80% de redução, assim, o efeito da biomassa foliar de *G. australis* foi mais intenso do que de *P. nitens* (Figura 22).

Os teores de clorofila α após a aplicação da biomassa foliar de *H. achroceus* e *C. langsdorffii* foram menores apenas para a maior concentração (100mg L⁻¹) (Tabelas 18), não sendo possível o ajuste de modelo matemático (Figura 23). Essas duas espécies haviam reduzido consideravelmente os teores de clorofila α no Estudo 6, mas com níveis de eficácia ainda inferiores aos evidenciados por *G. australis* e *P. nitens*.

Nos ecossistemas, as plantas podem interagir de diversas maneiras com outras plantas e/ou microorganismos via produção de compostos químicos oriundos do metabolismo secundário que são liberados no ambiente (BERTIN et al., 2003). Esta interação é conhecida como alelopatia e pode conduzir a resultados benéficos ou prejudiciais a determinadas espécies e/ou comunidades. Os compostos oriundos do metabolismo secundário, conhecidos como compostos alelopáticos ou aleloquímicos, podem ser liberados para o ambiente através da exsudação das raízes, lixiviação de caules e folhas, por emissões voláteis de folhas ou por degradação da biomassa vegetal no solo e/ou na água (BERTIN et al., 2003). Estes compostos orgânicos são encontrados em todas as partes das plantas (raízes, caules, rizomas, flores, inflorescência, folhas, sementes e pele

das sementes) e participam de interações químicas entre os organismos (CUI et al., 2012). Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes causam inibição ou estimulação do desenvolvimento de outras espécies já estabelecidas no local (CARVALHO, 1993; GOLDFARB et al., 2009).

A influência de aleloquímicos contra organismos fototróficos planctônicos tem ganhado a atenção sob o aspecto da ecologia e manejo da qualidade de águas doces (LAUE et al., 2014). Aleloquímicos tem sido considerado como um mecanismo ecológico capaz de estabilizar o estado dominado por macrófitas (HILT; GROSS, 2008). Aleloquímicos lixiviados de palhas de cereais ou serrapilheiras de espécies arbóreas foram aplicadas para combater a proliferação de fototróficos indesejáveis, como as cianobactérias (RIDGE; WALTERS; STREET, 1999). Compostos secundários de plantas, tal como a cevada, apresenta vários polifenóis e quinonas (RIFGE; PILLINGER, 1996; WAYBRIGHT; TERLIZZI; FERRIER, 2009) tem sido discutidos como xenobióticos naturais que controlam algas e cianobactérias. Infelizmente, nem sempre os dados encontrados são consistentes, e existem relatos que a palha da cevada também estimularam o crescimento de algumas espécies (MARTIN; RIDGE, 1999).

Apenas as biomassas foliares de *G. australis* e *P. nitens* foram eficientes em promover o controle de *M. aeruginosa*, reduzindo os teores de clorofila α . Essas duas espécies que já haviam proporcionado os maiores níveis de eficácia no controle de *M. aeruginosa* nos Estudo 6, tiveram o efeito confirmado ressaltando a necessidade de estudos mais aprofundados para a exploração de suas potencialidades.

Tabela 18. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 7a e em sua duplicata 7b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha.

Tratamentos	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
<i>Guatteria australis</i>				
Testemunha	3,51	100,00	3,49	100,00
areia *	3,66	104,30	3,57	102,14
10	3,05	86,88	3,51	100,36
25	2,54	72,41	2,94	84,19
50	0,80	22,94	0,31	9,00
100	0,17	4,95	0,12	3,58
F tratamentos	310,82		310,81	
C.V. %	8,10		8,0,9	
D.M.S - T a 5%	0,19	5,55	0,30	5,55
<i>Pterogyne nitens</i>				
Testemunha	3,51	100,00	3,49	100,00
areia *	3,66	104,30	3,57	102,14
10	2,94	83,78	2,73	78,21
25	2,27	64,71	2,00	57,28
50	1,25	35,50	1,20	34,38
100	0,71	20,18	0,69	19,99
F tratamentos	236,91		236,90	
C.V. %	7,36		7,35	
D.M.S - T a 5%	0,18	5,26	0,36	5,26
<i>Handroanthus ochroceus</i>				
Testemunha	3,51	100,00	3,49	100,00
areia *	3,66	104,30	3,57	102,14
10	3,33	94,96	3,56	102,14
25	3,37	96,07	3,60	103,07
50	3,71	105,70	3,59	102,78
100	3,03	86,39	2,99	85,55
F tratamentos	3,27		3,27	
C.V. %	8,94		8,93	
D.M.S - T a 5%	0,32	8,81	0,33	8,81
<i>Copaifera langsdorffii</i>				
Testemunha	3,51	100,00	3,49	100,00
areia *	3,66	104,30	3,57	102,14
10	3,82	108,76	3,93	112,50
25	3,59	102,33	3,40	97,30
50	3,09	88,12	3,16	90,40
100	2,84	80,83	2,36	67,70
F tratamentos	13,51		13,67	
C.V. %	6,66		9,66	
D.M.S - T a 5%	0,24	6,53	0,33	9,44

Obs: * testemunha auxiliar com areia; C.V. % = Coeficiente de Variação; D.M.S.- T a 5%= Diferença Mínima Significativa; **= significativo a 1% de probabilidade pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;5;18)} = 2,77$; $F_{\text{tab.}(0,01;5;18)} = 4,24$.

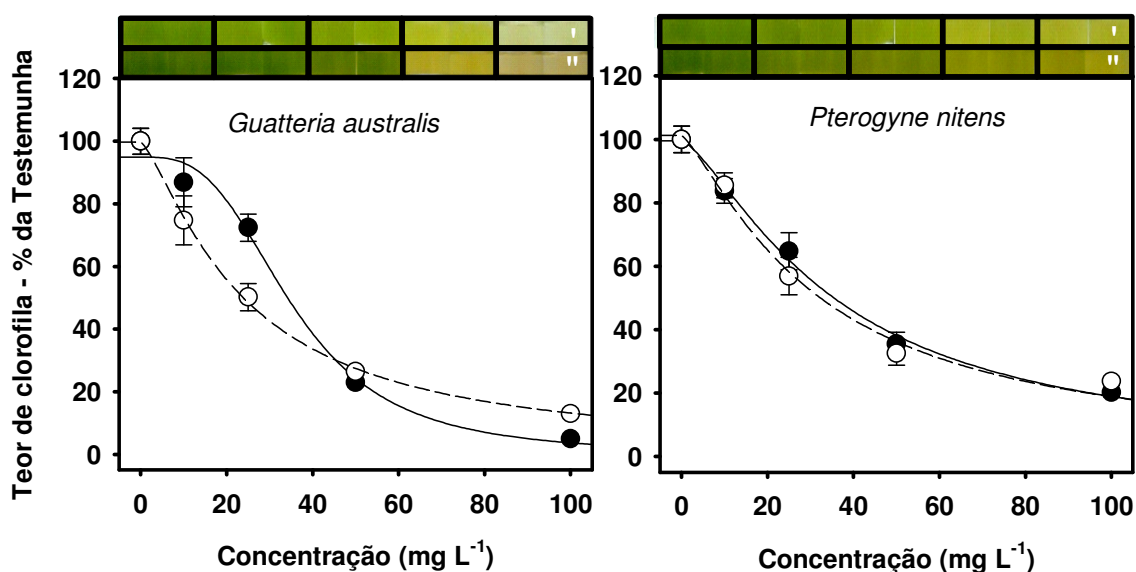


Figura 22. Efeito da concentração de biomassa foliar no teor de clorofila α de *M. aeruginosa*. $\bullet$ e $\circ$ representam as médias com o modelo ajustado para o ensaio (') e sua sua duplicata (''), respectivamente. *G. australis* ($y' = 94,9387/1+(x/3,0849)^{35,3628}$, $R^2 = 0,9949$; $y'' = 99,6993/1+(x/1,3175)^{23,9956}$, $R^2 = 0,9995$). *P. nitens* ($y' = 99,5572/1+(x/1,4073)^{35,7072}$, $R^2 = 0,9972$; $y'' = 101,2610/1+(x/1,2823)^{31,7342}$, $R^2 = 0,9942$). As barras verticais correspondem ao desvio padrão. Os retângulos em escala de verde acima dos gráficos correspondem a fotos das unidades experimentais.

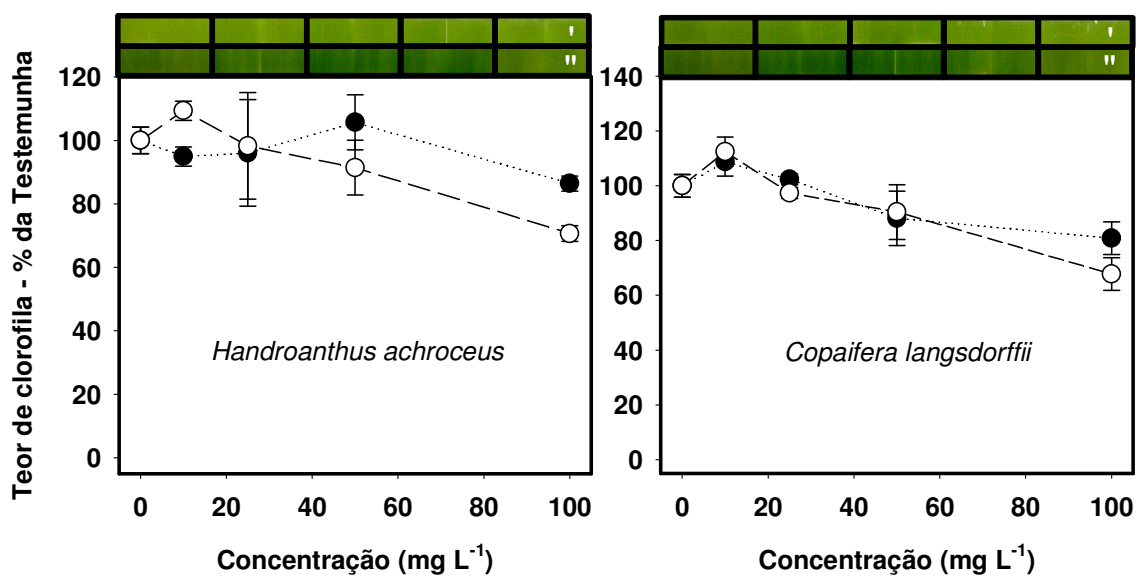


Figura 23. Efeito da concentração de biomassa foliar no teor de clorofila α de *M. aeruginosa*. ● e ○ representam as médias para o ensaio (') e sua sua duplicata (''), respectivamente. As barras verticais correspondem ao desvio padrão. Os retângulos em escala de verde acima dos gráficos correspondem a fotos das unidades experimentais.

6.8 Estudo 8: Variabilidade do efeito da biomassa foliar de plantas individuais de *Guatteria australis* e *Pterogyne nitens* no controle de *M. aeruginosa*

O efeito da biomassa oriunda de plantas individuais de *G. australis* (Ensaio 8a e sua duplicata 8b) e *P. nitens* (Ensaio 8c e sua duplicata 8d) sobre o teor de clorofila α de *M. aeruginosa* está apresentado nas Tabelas 19 e 20, respectivamente. A eficiência relativa das diferentes biomassas está representada nas Figuras 24 e 25.

Consideráveis variações entre as diferentes plantas foram observadas para ambas as espécies. Dentre as plantas de *G. australis* foram as biomassas foliares das plantas 2, 3, 6 e 7 que proporcionaram as maiores reduções nos teores de clorofila (Tabela 31 e Figura 11) e para *P. nitens* foram as plantas 1, 3, 4, 5, 10, 13 e 14 (Tabela 32 e Figura 12). Possivelmente as quantidades e/ou a composição química entre as plantas de mesma espécie são variáveis mesmo quando as idades das plantas, o tipo de tecido amostrado e as condições de cultivos são similares para todas elas. Diferenças no efeito de extratos aquosos de folhas de plantas de *Calophyllum brasiliensis* (guanandi) também foram observadas por Rombola (2014) e, o autor atribuiu a resposta à variabilidade genética da espécie. O efeito da palha de cevada (*Hordeum vulgare*), uma das poucas espécies com relatos de aplicação prática também são bastante variáveis, com valores de 7,5 a 0,1g de material seco L⁻¹ (XIAO et al., 2010).

A utilização de biomassa vegetal no controle de cianobactérias indesejáveis é restrita ao uso de palha de cevada. Diferentes estudos relataram que a decomposição da palha de cevada em ambiente oxigenado liberaram e/ou produziram substâncias que inibem o crescimento de algumas espécies de cianobactérias indesejáveis (GIBSON et al., 1990; NEWMAN; BARRETT, 1993; MARTIN; RIDGE, 1999). No entanto, os produtos químicos exatos oriundos da decomposição da palha de cevada ainda não são bem reconhecidos, mas algumas pesquisas sugerem que compostos fenólicos oxidáveis ou radicais livres são os responsáveis pela inibição do crescimento de cianobactérias (CHOE; JUNG, 2002; WAYBRIGHT; TERLIZZI; FERRIER, 2009). Rombola (2014) também sugere que folhas de guanandi apresentam potencial para serem utilizadas no controle de *M. aeruginosa*, devendo ser aplicadas de forma preventiva às florações, ou de forma contínua com o plantio do guanandi em áreas próximas a lagoas ou reservatórios, que geralmente apresentam problemas com florações de cianobactérias, nos períodos mais quentes.

O efeito inibitório é resultado da soma de diversos fatores, incluindo potencial tóxico da substância, a sensibilidade da cepa testada e seu estado fisiológico, além das condições do ambiente (LAUE et al., 2014). Por fim, os resultados observados confirmaram o potencial dessas duas espécies oriundas de biomas brasileiros na inibição do crescimento de *M. aeruginosa*, revelando possíveis alternativas no controle da proliferação dessa cianobactéria. Também há a possibilidade de uso da biomassa dessas espécies como ponto de partida para a identificação de compostos com potencial de controle de cianobactérias.

Tabela 19. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 8a e em sua duplicata 8b, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha, referente a 10 indivíduos de *Guatteria australis*.

Tratamentos	Ensaio 8a		Ensaio 8b	
	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	4,11	100,00	4,09	100,00
Areia	4,31	104,99	4,15	101,49
Indivíduo 1	3,56	86,67	3,95	96,52
Indivíduo 2	1,68	41,09	2,03	49,70
Indivíduo 3	1,81	44,08	2,11	51,63
Indivíduo 4	2,25	54,93	2,82	68,85
Indivíduo 5	2,84	69,27	2,99	73,08
Indivíduo 6	2,02	49,28	2,37	57,84
Indivíduo 7	1,89	46,19	1,97	48,14
Indivíduo 8	2,69	65,46	2,71	66,31
Indivíduo 9	2,34	57,06	2,56	62,51
Indivíduo 10	2,10	51,16	2,46	60,11
F tratamentos		33,19		13,92
C.V. %		11,83		14,93
D.M.S - T a 5%	0,31	7,70	0,43	10,55

C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S.= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;11;36)} = 2,06$; $F_{\text{tab.}(0,01;11;36)} = 2,78$.

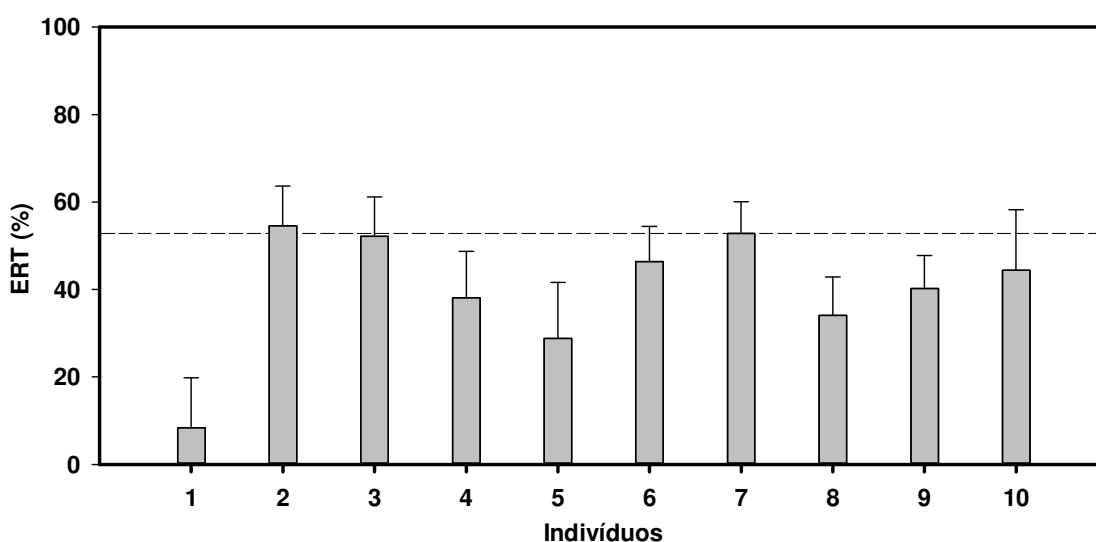


Figura 11. Eficiência Relativa dos Tratamentos (ERT - %), referente ao efeito da biomassa coletas de 10 plantas de *Guatteria australis* individualmente. A concentração utilizada foi de $0,35\text{mg L}^{-1}$. Os dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

Tabela 20. Médias de tratamentos e resultados da análise estatística dos teores de clorofila α observados no Ensaio 8c e em sua duplicata 8d, expressos em mg L^{-1} e em porcentagem da média da testemunha, referente a 14 indivíduos de *Pterogyne nitens*.

Tratamentos	Ensaio 8c		Ensaio 8d	
	mg L^{-1}	% da Testemunha	mg L^{-1}	% da Testemunha
Testemunha	3,23	100,00	2,04	100,00
Areia	3,17	97,90	2,08	101,49
Indivíduo 1	0,99	30,69	0,81	39,67
Indivíduo 2	1,29	40,03	1,03	50,36
Indivíduo 3	1,05	32,60	0,87	42,48
Indivíduo 4	0,99	30,54	0,80	39,14
Indivíduo 5	1,04	32,29	0,81	39,66
Indivíduo 6	1,54	47,52	1,19	58,44
Indivíduo 7	1,64	50,90	1,19	58,28
Indivíduo 8	2,03	62,81	1,34	65,55
Indivíduo 9	2,07	64,15	1,40	68,39
Indivíduo 10	1,08	33,49	0,88	43,17
Indivíduo 11	1,51	46,80	1,08	52,93
Indivíduo 12	1,84	56,88	1,35	65,94
Indivíduo 13	0,92	28,68	0,87	42,79
Indivíduo 14	0,91	28,32	0,84	41,26
F tratamentos		64,32		50,23
C.V. %		11,66		9,72
D.M.S - T a 5%	0,18	5,74	0,11	5,64

C.V. (%) = Coeficiente de Variação; D.M.S.= Diferença Mínima Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; $F_{\text{tab.}(0,05;15;48)} = 1,88$; $F_{\text{tab.}(0,01;15;48)} = 2,43$.

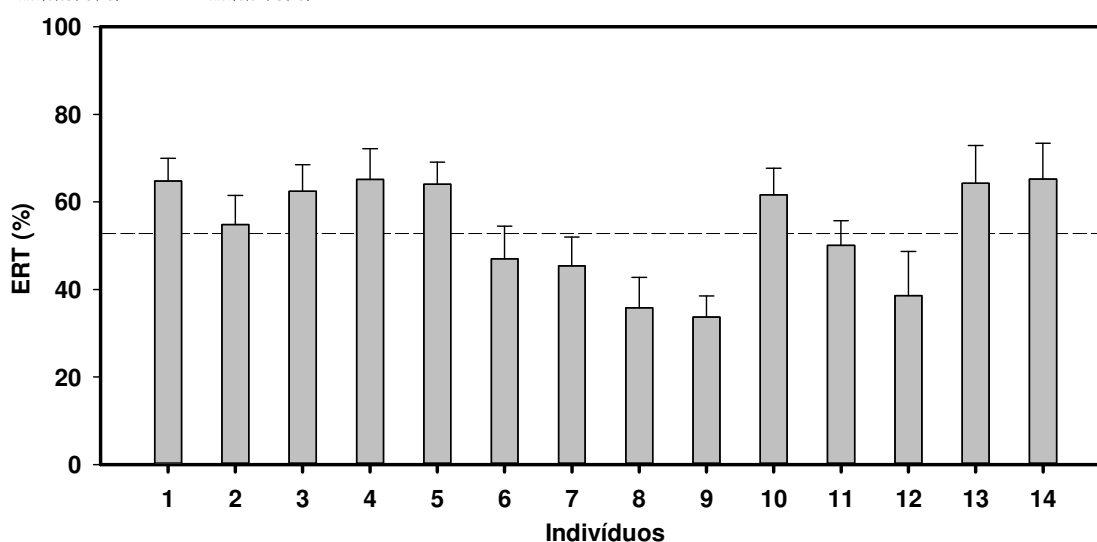


Figura 12. Eficiência Relativa dos Tratamentos (ERT - %), referente ao efeito da biomassa coletas de 10 plantas de *Pterogyne nitens* individualmente. A concentração utilizada foi de $0,35\text{mg L}^{-1}$. Os dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão considerando os dois ensaios conduzidos.

6 CONCLUSÕES

Para as condições em que foram realizados os experimentos, conclui-se que:

- Dentre todos os compostos testados, o diquat, o diuron e o sulfato de cobre foram os mais efetivos em reduzir o teor de clorofila α e o acúmulo de microcistina LR de *Microcystis aeruginosa*.
- Nos estudos com teor inicial de clorofila α de $0,5\text{mg L}^{-1}$ o diquat demonstrou elevado potencial de controle de *M. aeruginosa* nas concentrações de 0,1 e $0,2\text{mg L}^{-1}$. O diuron foi mais efetivo em reduzir os teores de microcistina LR total do que em reduzir os teores de clorofila α . O sulfato de cobre utilizado na concentração de $0,2\text{mg L}^{-1}$ foi efetivo na redução dos teores de clorofila α e microcistina LR total.
- No estudo com alta densidade cianobactérias (teor inicial de clorofila α de $3,42\text{mg L}^{-1}$), o diquat, diuron e sulfato de cobre também foram eficientes no controle de *M. aeruginosa*, reduziram o teor de clorofila α , mas o teor de microcistina LR foi preservado. Nessa condição, o diquat foi o agente de controle de *M. aeruginosa* de maior eficiência.

- Dentre as biomassas avaliadas, as espécies arbóreas nativas *Guatteria australis* e *Pterogyne nitens* foram selecionadas por serem mais efetivas em reduzir o teor de clorofila α e o acúmulo de microcistina LR total, demonstrando potencial para o controle de *M. aeruginosa* com DR₅₀ de 350 e 347kg ha⁻¹, respectivamente.
- Quando as biomassas de diferentes indivíduos de *G. australis* e *P. nitens* foram avaliadas isoladamente, os resultados mostraram expressiva variabilidade no potencial de controle de *M. aeruginosa*.
- Os métodos ajustados para determinação de microcistina LR permitem o monitoramento da toxina e outras cianotoxinas.

7 REFERÊNCIAS

- ALUM, A. et al. Cement-based biocide coatings for controlling algal growth in water distribution canals. **Cement & Concrete Composites**, v. 30, p.839–847, 2008.
- APELDOORN et al. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.
- AZEVEDO, S.M.F.O. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BALL, A.S. et al. Algal growth control by a barley straw extract. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 177-181, 2001.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L. A. The role root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 256, p. 67-83, 2003.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, p. 51-60, 2003.
- BLACK, K.; YILMAZ, M.; PHILIPS, E.J. Growth and toxin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Kutzing) Lemmerman at elevated salt concentration. **Journal of Environmental Protection**, v. 2, p. 669-674, 2011.
- BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 1683–1688, 1995.
- BOOPATHI, T.; Ki, J. Impact of Environmental Factors on the Regulation of Cyanotoxin Production. **Toxins**, v. 6, p. 1951-1978, 2014.
- BOTELHO, J.R.S. et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **J. Supercritical Fluids**, v.98, p.167–171, 2015.

BRANDÃO, L.H.; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 40-50, 2006.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Programa Nacional de Capacitação de Gestores Ambientais. **Módulo específico: Licenciamento ambiental de estações de tratamento de esgoto e aterros sanitários**. Brasília, DF: MMA, 2009, 67p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA N° 467/2015, de 07/2015. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jul. 2015, n. 135, Seção 1, pag. 70-71.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**, Brasília, DF, 2003. Disponível em [HTTP://http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12/2011. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 268-287, 2010.

CARVALHO, L.R. de. Cianotoxinas. In: SANT'ANA, C.L. et al. (Eds.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Interciência, Rio de Janeiro. p. 9-19, 2006.

CARVALHO, M.C. et al. (Eds.). **Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais**. São Paulo: CETESB, 2013. 43p.

CARVALHO, S. I. C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

CEBALLOS-LAITA, L. et al. γ -lindane increases microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Marine Drugs**. V. 13, p. 5666-5680, 2015.

CHOE, S.; JUNG, I. Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 8, n. 4, p. 297-304, 2002.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (EDS.) **Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London: E&FN Spon, 1999. 416p.

COLES, J.F.; JONES, R.C. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a Tidal freshwater river. **J. Phycol.**, v. 36, p. 7-16, 2000.

- COSTA, A.R.M. et al. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **J. of Supercritical Fluids**, v.100, p.86–96, 2015.
- CUI, C. et al. Isolation and identification of allelochemicals in rizosphere and adjacent soil under walnut (*Juglans regia* L.) trees. **Allelopathy Journal**, v. 29, n.1, p. 25-36, 2012.
- DAI, R. et al. Effects of amino acids on microcystin production of the *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Hazardous Materials**. v. 161, p. 730-736, 2009.
- DOURADO, M.C.; SILVA, T.R.B.; BOLONHEZI, A.C. Matéria seca e produção de grãos de *Crotalaria juncea* L. submetida à pode e adubação fosfatada. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 287-293, 2001.
- FABER, M.J. et al. Impact of glufosinate-ammonium and bialaphos on the phytoplankton community of a small eutrophic Northern Lake. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 7, pp. 1282–1290, 1998.
- FALCÓN, L.I.; MAGALLÓN, S.; CASTILLO, A. Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. **ISME J.**, v. 4, n. 6, p. 777-783, 2010.
- FAN, J. et al. Evaluating the effectiveness of copper sulphate, chlorine, potassium permanganate, hydrogen peroxide and ozone on cyanobacterial cell integrity. **Water Research**, v. 47, p. 5153-5164, 2013.
- FORTIN N. et al. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5105-5112, 2010.
- GARCIA-VILLADA, L. et al. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algaecide. **Water Research**, v. 38, p. 2207-2213, 2004.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Impacto ambiental da transformação diuron: uma revisão. **Chemosphere**, v. 56, p. 1021-1032, 2004.
- GIBSON, M. T. Barley straw as an inhibitor of algal growth II: laboratory studies. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 3, p. 241-248, 1990.
- GOLDFARB, M. et al. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n.1, p. 23-28, 2009.
- GUN, G.F. et al. Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (Cyanobacteria). **Veterinary Record**. V. 130, n. 14, p. 301-302, 1992.
- GUPTA V. et al. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) – Prospects and challenges. **Algal Research**, v. 2, p. 79-97, 2013.
- HA, J.H.; HIDAKA, T.; TSUNO, H. Analysis of factors affecting the ratio of microcystin to chlorophyll-a in Cyanobacterial blooms using real-time polymerase chain reaction. **Environmental Toxicology**. v. 26, n. 1, p. 21-28, 2011.

HARADA, K. et al. Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature. **Phycologia**, v. 35, n. 6S, p. 83-88, 1996.

HEIDORN T. et al. Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions. **Methods in Enzymology**, v. 497, p. 539–579, 2011.

HILT, S.; GHOBRIAL, M.G.N.; GROSS, E.M. In situ allelopathic potential of *Myriophyllum verticillatum* (Haloragaceae) against selected phytoplankton species. **J. Phycol.**, v. 42, p. 1189–1198, 2006.

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

HITZFELD, B.C.; HÖGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. **Environmental Health perspectives Supplements**, v.108, p.113-122, 2000.

HOBSON, P. et al. Alternative and innovative methods for source water management of algae and cyanobacteria, 978-1-60573-178, **Water Research Foundation**, 2012.

HONG, Y. et al. Isolation and characterization of antialgal allelochemicals from *Arunundo donax* L. **Allelopathy J.**, v. 25, p. 357-368, 2010.

JANCULA, D.; MARSÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. **Chemosphere**. v. 85, p. 1415–1422, 2011.

JAYATISSA, L.P. et al., Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. **Systematic and Applied microbiology**, v.29, p. 156-164, 2006.

JOCHIMSEN, E.M. et al., Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **N Engl J Med.**, v. 338, n. 13, p. 873-8, 1998.

KAASALAINEN U. et al. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 109, p. 5886-5891, 2012.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E.Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1189-1200, 2000.

KIM, J.D. et al. Alga-lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). **Biological Control**, v. 41, p. 296–303, 2007.

KULL, T.P.J. et al. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 6025-6031, 2004.

LANKOFF, A. et al. Nucleotide excision repair impairment by nodularin in CHO cell lines due to ERCC1/XPF inactivation. **Toxicol. Lett.**, v. 179, p.101–107, 2008.

LAUE, P. et al. Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine. **Chemosphere**, v. 104, p. 212-220, 2014.

LEE, R.E. **Phycology**, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2008 ,p.547.

LEE, T. et al. In vivo fluorometric method for early detection of cyanobacterial waterblooms. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, p. 489-495, 1994.

LEE, T.A. Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in shallow temperate lake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 318-325, 2015.

LI, F.M., HU, H.Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 6545–6553, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum; 1992.

LU, X. et al., Environmental factors influencing cyanobacteria community structure in Dongping Lake, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 11, p. 2196-2206, 2013.

MA, J. et al. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. **Ecotox Environ Safe**, v. 63, p. 268–274, 2006.

MA, J. et al. Toxicity of Seven Herbicides to the Three Cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* and *Mirocystis aeruginosa*. **International Journal of Environmental Research**, v.4, n.2, p. 347-352, 2010.

MA, M. et al. Chlorination of *Microcystis aeruginosa* suspension: Cell lysis, toxin release and degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217-218, p. 279-285, 2012.

MARTIN, D.; RIDGE, I. The relative sensitivity of algae to decomposing barley straw. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 285-291, 1999.

McFADDEN, G.I. Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6 n. 4, p.1-9, 2014.

NAKAGAWA, M.; TAKAMURA, Y.; YAGI, O. Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium, *microcystis-aeruginosa* k-3a. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 329–337, 1987.

NAKAI, S. et al. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 34, p. 3026-3032, 2000.

NETHERLAND, M.D.; LEMBI, C.A.; POOVEY, A.G. Screening of Various Herbicide Modes of Action for Selective Control of Algae Responsible for Harmful Blooms. **Aquatic Nuisance Species**, ERDC/TN ANSRP-9-2, 2009.

NEWMAN, J. R.; BARRETT, P.R.F. Control of *Microcystis aeruginosa* by decomposing barley straw. **J. Aquat. Plant Manage.**, v. 31, p. 203-206, 1993.

NOGUEIRA, J.C.B. **Reflorestamento misto com essências nativas: a mata ciliar**. São Paulo: Instituto Florestal, 2010. 148p.

PADOVESI-FONSECA, C.; PHILOMENO, M.G. Effects of algicide (copper sulfate) application on short-term fluctuations of phytoplankton in Lake Paranoa, Central Brazil. **Journal of Biology**, 64, p. 819–826, 2004.

PAIVA, L.A.F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p. 303–307, 2002.

PARK, H. et al. [D-Leu(1)] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 855-862, 2001.

PARK, M. et al., Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (*Cyanophyceae*) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. **Aquatic Botany**, v. 90, n. 4, p. 309-314, 2009.

PEREIRA, S.R.; VASCONCELOS, V.M.; ANTUNES, A. Computational study of the covalent bonding of microcystins to cysteine residues – a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases. **FEBS Journal**, v. 280, p. 674-680, 2013,

PERSAUD, A.D. et al. Forecasting cyanobacteria dominance in Canadian temperate lakes. **Journal of Environmental Management**, v. 151, p. 343-352, 2015.

PHLIPS, E.J.; HANSEN, P.; VELARDI, T. Effect of the herbicide diquat on the growth of microalgae and cyanobacteria. **Environ. Contam. Toxicol.**, n. 49, p. 750-756, 1992.

PRESCOTT, G.W. *Algae of the western Great Lakes area.*, Iowa: W.M.C. Brown Company. 6ª ed, p.977, 1975.

QIAN, H. et al. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 847-859, 2012.

QIAN, H. et al. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 405-412, 2010.

REGASINI, L.O. **Estudo químico de *Pterogybe nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcaloides guanidínicos e análogos**. 2008. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de química de Araraquara, 2008.

REGASINI, L.O. et al. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1739–1744, 2008.

RIDGE, I.; PILLINGER, J.M. Towards understanding the nature of algal inhibitors from barley straw. **Hydrobiologia**, v. 340, p. 301–305, 1996.

RIDGE, I.; WALTERS, J.; STREET, M. 1999. Algal growth control by terrestrial leaf litter: a realistic tool? **Hydrobiologia**, v. 395/396, 173–180, 1999.

RODGER, H.D. et al. Cyanobacterial (blue-green algal) Bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. **Journal of Fish Diseases**. V. 17, n. 2, p. 177-181, 1994.

ROMBOLA, Tiago Henrique. **Efeito do extrato aquoso de folhas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) no controle do crescimento de *Microcystis aeruginosa***. 2014. vi, 73 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2014.

ROSS, C.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L.; PAUL, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 66-73, 2006.

SARAIVA, M.E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141–153, 2015.

SCHIRRMESTER, B.E. et al. The origino of multicellularity in cyanobacteria. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 45, 2011.

SHAO, J. et al. Interactive effects of algicidal efficiency of *Bacillus* sp. B50 and bacterial community on susceptibility of *Microcystis aeruginosa* with different growth rates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p.1-6, 2015.

SIQUEIRA, C.A.T. et al. Bioactivity and chemical composition of the essential oil from the leaves of *Guatteria australis* A.St.-Hil. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2015.

SOUZA, J.P.B. et al. Leishmanicidal and antimalarial activities of crude extracts from aerial parts of *Copaifera langsdorffii* and isolation of secondary metabolites, **J. Pharmacy Research**, v.5, p. 4103–4107, 2012.

SRIVASTAVA, A. et al. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial Bloom. **Environmental Science & Technology**. v. 47, p. 8999-9013, 2013.

STANIER, R.Y. et al. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, v.35, n.2, p. 171-205, 1971.

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**. v. 28, n.1, p. 479-484, 1988.

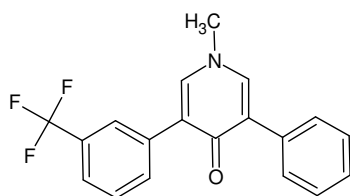
SUI, X. et al. A novel photocatalytic material for removing microcystin-LR under visible light irradiation: degradation characteristics and mechanisms. **PlosOne**, v.9, n. 4, e95789, 2014.

- TAJIMA, Y. et al. Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, is a novel substrate for human ABC transporter ABCB1. **Phytomedicine**, v. 21, p. 323–332, 2014.
- TILLET, D. et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chem. Biol.**, v. 7, p. 753-764, 2000.
- UALLACHAIN, D.O.; FENTON, O. Barley (*Hordeum vulgare*) induced growth inhibition of algae: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 651-658, 2010.
- VELINI, E.D. **Desenvolvimento de técnicas e equipamentos para monitoramento e controle de plantas aquáticas**. 2005. 238f. Tese (Livre docência) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2008.
- WAYBRIGHT, T.J.; TERLIZZI, D.E.; FERRIER, M.D. Chemical characterization of the aqueous algistatic fraction of barley straw (*Hordeum vulgare*) inhibiting *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 333-340, 2009.
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. **Dordrecht Kluwer**, p.669, 2000.
- XIAO, X. et al. A pair of chiral flavonolignans as novel anti-cyanobacterial allelochemicals derived from barley straw (*Hordeum vulgare*): characterization and comparison of their anti-cyanobacterial activities. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 1238-1251, 2014.
- XIAO, X. et al. Effects of Tibetan hulless barley on Bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) measured by different physiological and morphologic parameters. **Chemosphere**, v. 18, p. 1118-1123, 2010.
- YI, Y.L. et al. Growth inhibition and microcystin degradation effects of *Acinetobacter guillouiae* A2 on *Microcystis aeruginosa*. **Research in Microbiology**, v. 166, p. 93-101, 2015.
- YI, Y.L. et al. The antialgal activity of 40 medicinal plants against *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 847-856, 2012.
- ZHANG et al. The 2007 water crisis in Wuxi, China: Analysis of the origin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 130-135, 2010.
- ZHANG, C. et al. Algicidal activity of *Salvia miltiorrhiza* on *Microcystis aeruginosa* – Towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism. **Chemosphere**, v. 93, p. 997-1004, 2013.
- ZHANG, H. et al. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 34: p. 307–312, 2008.
- ZHOU, L.H. et al. Effect of five Chinese traditional medicines on the biological activity of red-tide causing alga – *Alexandrium tamarense*. **Harmful Algae**, v. 6, p. 354-360, 2007.

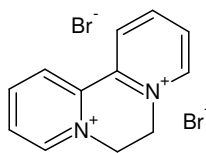
ZHOU, S. et al. Effects of different algaecides on the photosynthetic capacity, cell integrity and microcystin-LR release of *Microcystis aeruginosa*. **Science of the Total Environment**, v.463-464, p. 111-119, 2013.

APÊNDICE

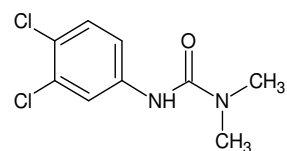
APÊNDICE 1: Estrutura química das substâncias testadas em *M. aeruginosa*



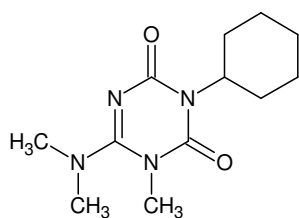
Fluridone



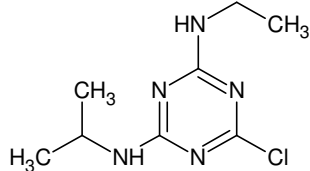
H₂O
Diquat



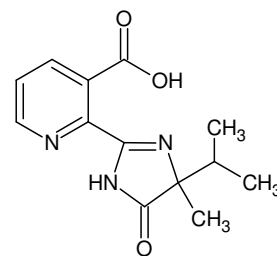
Diuron



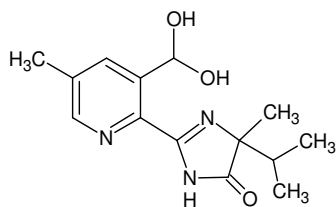
Hexazinone



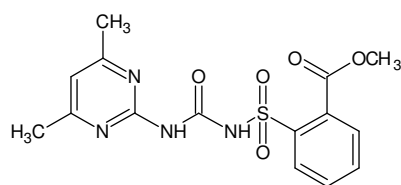
Ametrina



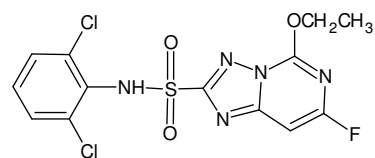
Imazapyr



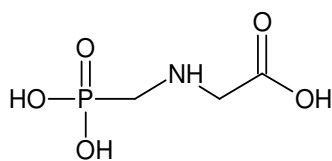
Imazapic



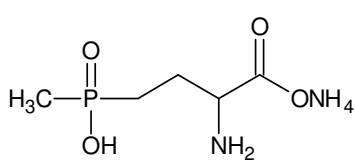
Sulfometuron-metil



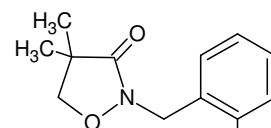
Dichlosulan



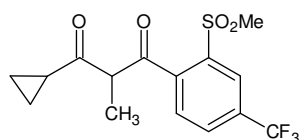
Glyphosate



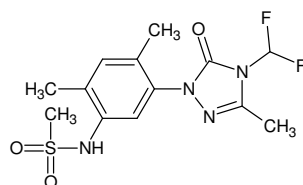
Glufosinate-ammonium



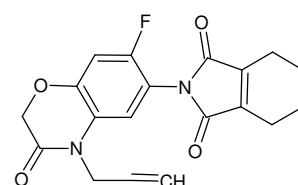
Clomazone



Diquetonitrila



Sulfentrazone



Flumioxazin

